

DOKTORI ÉRTEKEZÉS

Abiotikus és biotikus stresszorok hatása árpa és dohány növényekre

Harrach Borbála Dorottya



MTA Növényvédelmi Kutatóintézete

Budapest

2009

A doktori iskola

megnevezése: Kertészettudományi Doktori Iskola

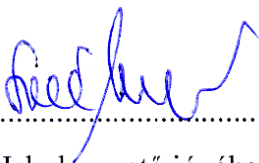
tudományága: Növénytermesztési és kertészeti tudományok


vezetője: Dr. Tóth Magdolna, D.Sc.
tanszékvezető egyetemi tanár
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar
Gyümölcstermő Növények Tanszék

Témavezető: Dr. Barna Balázs, D.Sc.
igazgató, tudományos tanácsadó
Magyar Tudományos Akadémia
Növényvédelmi Kutatóintézete

Egyetemi konzulens: Dr. Erdei Sára, C.Sc.
tudományos főmunkatárs
Budapesti Corvinus Egyetem, Kertészettudományi Kar
Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék

A Jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés védési eljárásra bocsátható.


.....
Az Iskolavezető jóváhagyása


.....
A Témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2009. június 9-ei határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG

Elnök:	Dr. Palkovics László, D.Sc. Budapesti Corvinus Egyetem
Tagok:	Dr. Lukács Noémi, Ph.D. Budapesti Corvinus Egyetem
	Dr. Gáborjányi Richard, D.Sc. Pannon Egyetem, Georgikon
	Dr. Virányi Ferenc, D.Sc. Szent István Egyetem
Opponensek:	Stefanovitsné Dr. Bányai Éva, D.Sc. Budapesti Corvinus Egyetem
	Dr. Janda Tibor, D.Sc. MTA Mezőgazdasági Kutatóintézet
Titkár:	Papp István, Ph.D. Budapesti Corvinus Egyetem

Tartalomjegyzék

Jelölések, rövidítések jegyzéke	8
1. BEVEZETÉS	9
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	11
2.1. Stressz, oxidatív stressz	11
2.1.1. Reaktív oxigénformák	12
2.1.2. A növények antioxidáns védelmi rendszere	14
2.1.3. Az oxidatív stressztűrés alakulása a növények élettani állapotának függvényében	17
2.2. Abiotikus stressz	18
2.3. Biotikus stressz: növény–kórokozó kapcsolatok	19
2.3.1. Vertikális (rasszspecifikus) és horizontális öröklött rezisztencia	20
2.3.2. Szisztémikus szerzett rezisztencia	22
2.3.3. Szisztémikus indukált rezisztencia	23
2.3.4. Szerzett fogékonyság	23
3. A MEGOLDANDÓ FELADATOK ISMERTETÉSE	25
4. ANYAG ÉS MÓDSZER	27
4.1. Kísérleti alanyok	27
4.1.1. Dohány	27
4.1.2. Árpa	27
4.2. Szimbiotikus kezelés	28
4.3. Abiotikus stresszorok	28
4.3.1. Higany-klorid kezelés	28
4.3.2. Hidrogén-peroxid kezelés	28
4.3.3. Sóstressz	29
4.3.4. Hősokk	29
4.4. Biotikus stresszorok	29
4.4.1. Dohány mozaik vírus	29
4.4.2. Árpa lisztharmat	30
4.5. Membránkárosodás vizsgálata	30
4.5.1. Elektrolit-kiáramlás mérése konduktométerrel	30
4.5.2. Etán-termelődés kimutatása	30
4.6. Az etilén stresszhormon gázkromatográfiás kimutatása	30
4.7. Zsírsav-összetétel meghatározása	31

4.8. Kalorimetria	31
4.9. Hidrogén-peroxid tartalom fluorimetriás meghatározása	32
4.10. Spektrofotometriás enzimaktivitás mérések	32
4.10.1. SOD	32
4.10.2. POX	33
4.10.3. CAT	33
4.10.4. APX	33
4.10.5. DHAR	33
4.10.6. GR	34
4.10.7. GST	34
4.11. Nem-enzimatis antioxiidánsok meghatározása	34
4.11.1. Aszkorbinsav-tartalom fotometriás mérése	34
4.11.2. Glutathion-tartalom fotometriás mérése	35
4.12. Génkifejeződési vizsgálatok	35
4.13. Statisztika	37
5. EREDMÉNYEK	39
5.1. A juvenilitás befolyása dohány oxidatív stressztűrő-képességére	39
5.2. A szalicilsav szerepe a SzSzR-ban	41
5.2.1. Dohány mozaik vírus tünetek	41
5.2.2. A levelek hőtermelése	42
5.2.3. Lipid-peroxidáció	43
5.2.4. Lipid-összetétel	43
5.3. Antioxiidáns és egyéb biokémiai változások különböző árpa–lisztharmat kapcsolatokban	45
5.3.1. Hidrogén-peroxid tartalom	45
5.3.2. Antioxiidáns enzimaktivitások	46
5.3.3. Aszkorbát- és glutathion-tartalom	49
5.3.4. Elektrolit-kiáramlás	51
5.3.5. Etilén-kibocsátás	52
5.4. Indukált rezisztencia	53
5.4.1. A <i>P. indica</i> növekedés-serkentő hatása sóstressz alatt is érvényesül	53
5.4.2. A <i>P. indica</i> ellensúlyozza a sókezelés okozta hőtermelés-csökkenést	54
5.4.3. Változások a zsírsav-összetételben	55
5.4.4. A <i>P. indica</i> csökkenti a sókezelt árpa lipid-peroxidációját	56
5.5. Hősokk	57
5.6. Új tudományos eredmények	59

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	61
6.1. A magasabb fokú abiotikus stressztűrő-képesség és a juvenilitás kapcsolata	61
6.2. A szalicilsav szerepe dohány szisztémikus szerzett rezisztenciájában	62
6.3. Az antioxidánsok szerepe árpa–lisztharmat kapcsolatok alakulásában	67
6.4. Szimbiózis szerepe sóstressz leküzdésében	71
6.5. Hősokkal előidézett lisztharmat-fogékonyságban indukálódó jelátviteli gének	76
7. ÖSSZEFOGLALÁS	79
8. SUMMARY	81
M1. Irodalomjegyzék	83
M2. A dolgozat témájában megjelent legfontosabb saját közlemények	105
Köszönetnyilvánítás	107

Jelölések, rövidítések jegyzéke

AA	aszorbát, aszkorbinsav (<i>ascorbic acid</i>)
APX	aszorbát-peroxidáz
<i>Bgh</i>	<i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>
BI-1	<i>Bax Inhibitor-1</i>
CAT	kataláz
DHA	dehidroaszorbát
DHAR	dehidroaszorbát-reduktáz
GR	glutation-reduktáz
GSH	redukált glutation
GSSG	oxidált glutation
GST	glutation-S-transzferáz
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid
HR	túlérzékenységi válasz (<i>hypersensitive reaction</i>)
HSP70	hőshock-fehérje (<i>heat shock protein 70</i>)
MDHA	monodehidro-aszorbát
MDHAR	monodehidro-aszorbát-reduktáz
PCR	nukleinsav-sokszorozítás polimeráz enzimmel láncreakcióban (<i>polymerase chain reaction</i>)
POX	gvajakol-függő peroxidázok
ROF	reaktív oxigénforma
RT-PCR	reverz transzkripcióval egybekötött nukleinsav-sokszorozítás
SOD	szuperoxid-dizmutáz
SzSzR	szisztémikus szerzett rezisztencia

1. BEVEZETÉS

Empirikus vizsgálatok alapján az ember (*Homo sapiens* L., Linnaeus 1753) – néhány módfelett ritka, fényevő példánytól eltekintve – túlnyomórészt heterotróf táplálkozású fajnak tekinthető, így életfolyamatainak fenntartása alapvetően az autotróf módon szént fixáló növények bekebelezésén és feldolgozásán alapul. Sőt, nem csupán közvetlen fogyasztásra használja a növényeket, de – roppant energiapazarló módon – közvetetten, más heterotróf szervezetek (állatok, Brehm 1863) által már eleve nagy energiaveszteség árán átalakítva is fogyasztja őket (takarmány-előállítás). Továbbá környezetének megváltoztatására (építkezési alapanyagok), ökológiai optimumának kialakítására (fűtés), sőt, lét- és fajfenntartási szükségletein jócskán túlmutató, kizárólag eme egyetlen fajra jellemző viselkedésformáinak (utazgatás) gyakorlásához („bio”-üzemanyag, etanol) is a növényekre van utalva. A Földön egyre hajmeresztőbb ütemben elszaporodó ember mindig nagyobb és nagyobb mennyiségű növényi anyag előállítását igényli igencsak korlátozott méretű mezőgazdaságilag hasznosítható, megművelhető földterületeken, miközben a klimatikus tényezők is egyre kedvezőtlenebbül alakulnak (szikesedés, sivatagosodás), éppen az ember sok, környezetre káros tevékenysége nyomán. Gondot jelent továbbá az ember számára, hogy az általa megtermelt növények nagy részét más fajok nála fürgébben hasznosítják (kártévők és kórokozók). Az egyre nagyobb megkívánt hozam érdekében azonban nem lehet a Földet a végtelenségig terhelni műtrágyák és növényvédő szerek használatának ilyen ütemben való fokozásával – vagy sürgősen nézhetünk másik bolygó után. Égetően szükséges tehát a növények környezeti stresszekkel, illetve betegségekkel szembeni ellenállóságának a pontosabb megismerése, majd olyan környezetkímélő termesztési és növényvédelmi eljárások kidolgozása, melyek segítségével a termést érő károkat, veszteségeket jelentősen csökkenteni lehet.

A növényeket a környezetükből érő szinte valamennyi, szöveti károsodással járó, abiotikus vagy biotikus stressz reaktív oxigénformák gyors felhalmozódását idézi elő (Baker és Orlandi 1995, Bestwick *et al.* 1997, Hückelhoven és Kogel 1998). A különböző, igen reakcióképes oxigénvegyületek sejtkárosító hatásának kivédése az antioxidáns rendszerek fontos feladata a növényekben (Vanacker *et al.* 1998). Az enzimatis és nem-enzimatis antioxidánsok mennyisége és aktivitása jelentős mértékben változik a növények élettani állapotával; tehát a növények kora, tápanyag-ellátottsága, avagy egy korábbi stresszre kialakult válasza nagymértékben befolyásolja az oxidatív stressztűrő-képességüket (Barna 1995, Barna *et al.* 2003a). Jelen munkámban egyrészt a növények kedvezőtlen környezeti hatásokkal és/vagy kórokozókkal szembeni tűrőképességében vizsgáltam az antioxidatív rendszer szerepét, másrészt igyekeztem bepillantást nyerni a különféle eredetű oxidatív stressz során aktiválódó jelátviteli rendszerek bizonyos elemeinek alakulásába.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Stressz, oxidatív stressz

Az élőlények számára megterhelést jelentő helyzeteket, melyek a szervezetben a rendes viselkedéstől való eltéréshez vezetnek, stressznek nevezzük a növények esetében is. A stressz kifejezést elsőként Selye János endokrinológus használta az 1930-as években, élettani válaszok leírására. Selye a későbbiekben tudományos felismerésének alkalmazását kiterjesztette a mindennapi élet jelenségeinek értelmezésére is. Selye meghatározása szerint a stressz az élőlény válaszára, míg a stresszor a környezeti hatást jelöli. Az élő szervezeteket a legkülönbözőbb stresszorok részéről érhetik hatások, s e stressztényezőket többféle szempont szerint csoportosíthatjuk: lehet abiotikus vagy biotikus, illetve antropogén vagy természetes környezeti eredetű (Szigeti 1998). A stressz erősségének mértéke alapján megkülönböztethetjük a szervezet károsodásával, illetve pusztulásával járó, túráshatárt meghaladó mértékű distresszt a gyengébb hatású, elviselhető eustressztől, ami csak akkora terhelést ró egy adott élőlényre, hogy az a belső tartalékok mozgósítása révén nem csak védekezésre, de többlet teljesítményre is képes lesz tőle.

A növényeket érő stresszhatások (pl. erős fényintenzitás, szélsőséges hőmérsékletek, szárazság, só- vagy nehézfém-szennyezés, sebzés, rovarragás vagy -szívogatás, vírus-, baktérium- vagy gombafertőzés) következtében lényeges anyagcsere változások jönnek létre. Ezek egy része a stressz nélkül is meglévő anyagcsereutak, -kapcsolódások, -szabályozások módosulását, más részük új gének aktiválását követő alternatív biokémiai folyamatok sorát jelenti. Szinte valamennyi típusú (mind biotikus, mind abiotikus) stressz esetében az egyik legjellegzetesebb válasz a reaktív oxigénformák (ROF) képződése és a sejten belüli oxidatív mikrokörnyezet kialakulása.

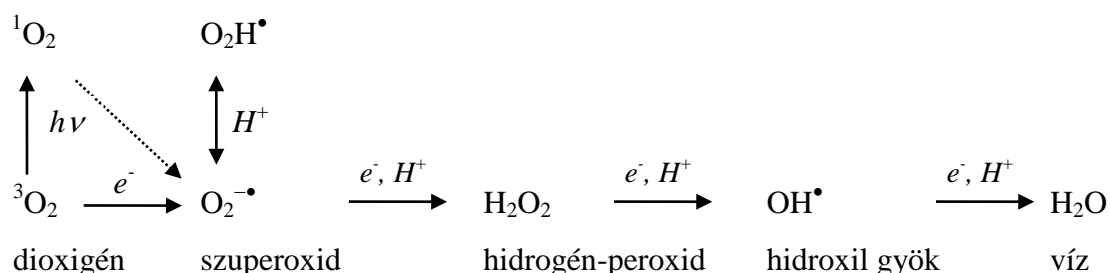
A földi élet számára nélkülözhetetlen oxigén, különböző redukált állapotaiban egyike az élő szervezetekre legnagyobb veszélyt jelentő anyagoknak. Az oxigén négyelektronos redukciója valamennyi aerob szervezetben végbemegy, ahol az oxigén a légzési lánc végső elektronakceptora. A folyamat köztes lépései során részlegesen redukált termékek képződnek. Míg a molekuláris oxigén nem számít reakcióképes vegyületnek (Cadenas 1989), az oxigén részlegesen redukált, reaktív formái igen reakcióképes, erősen oxidatív tulajdonságú vegyületek; részben szabad gyökök, mint pl. a szuperoxid és a hidroxil gyök, melyek párosítatlan elektronnal rendelkeznek; részben pedig olyan molekulák, melyek reakcióik során szabad gyök képzésére képesek, mint pl. a hidrogén-peroxid és a szinglett oxigén. ROF képződnek zavartalan élettani körülmények között is. A sejten belül képződött ROF semlegesítése többféle módon lehetséges: egyrészt elektrondonorok segítségével, mint pl. a glutation, aszkorbinsav, karotinoidok, tokoferol; illetve enzimek katalizálta reakciók révén, pl. szuperoxid-dizmutáz, peroxidázok, glutation-S-transzferáz, valamint az aszkorbát–glutation ciklus enzimeit által (Elstner 1982). Az **oxidatív stressz** kifejezés olyan

sejtállapotra vonatkozik, amelyben a ROF koncentrációja megemelkedik. Kialakulásához az oxidatív körülményeket kiváltó mechanizmusok, feltételek (biotikus vagy abiotikus stresszorok) valamint a sejt antioxidáns védelmi rendszere közötti finom egyensúly felborulása vezet (Apel és Hirt 2004, Cadenas 1989, Diaz-Vivancos *et al.* 2006, Scandalios 1990, Smirnov 1998).

Alapvető különbség van azonban a különböző típusú stresszorok között: a biotikus stressz kezdeti megnyilvánulása lokális, csak a fertőzési hely közvetlen környezetében lévő sejtek anyagcseréjét érinti, majd a kórfolyamat kifejlődésének, illetve a növény védekezésében szerepet játszó jelátviteli rendszer aktiválódásának következtében terjed ki befolyása fokozatosan az egész növényre. Az abiotikus stressz ezzel szemben egy időben fejti ki hatását a teljes növényi szervezetre. A ROF képződésének mechanizmusa szintén különböző a kétféle típusú stressz esetében: kórokozók fertőzése olyan növényi enzimek (sejtmembránban NAD(P)H-oxidáz, sejtfalhoz kötött peroxidázok) működését indukálja, amelyek szuperoxidot és hidrogén-peroxidot termelnek, az abiotikus stressz nyomán fokozott mennyiségben képződő ROF viszont főként a fotoszintetikus és a légzési elektrontranszportlánc zavarára vezethető vissza. A kétféle stressz eltérő módon hat a növény antioxidáns rendszerére is. Az abiotikus és biotikus stresszek kölcsönhatására irányuló vizsgálatok eredményét nagymértékben befolyásolja az alkalmazott abiotikus stresszor intenzitása, a kiválasztott gazda–kórokozó kapcsolat jellege, és a stresszorok egymáshoz viszonyított időzítése (Pogány *et al.* 2006).

2.1.1. Reaktív oxigénformák

Az oxigénmolekula két párosítatlan elektronnal rendelkezik, tehát kétszeresen is szabad gyök. Ehhez képest meglepően közömbös, aminek magyarázata abban rejlik, hogy alapállapotban triplett szerkezetű, azaz a két párnélküli elektronja azonos spinű, ezért más molekulákkal a Pauli-féle tilalmi elv értelmében nem reagálhat. Az életfolyamatok során azonban az oxigénnel való reakciók létfontosságúak. A kis reakcióképességű oxigént ennek érdekében aktiválni kell. Az oxigén aktiválása kétféleképpen történhet (1. ábra): ha ellentétes spinállású szinglett állapotra gerjesztődik, vagy ha egyelektronos redukcióval negatív töltést kap, majd sorozatosan redukálódik egy-egy további elektron felvételével.



1. ábra. Az oxigén aktiválása.

A reaktív oxigénformák (ROF) részben párosítatlan elektronnal rendelkező szabad gyökök, részben olyan aktív molekulák, amelyek szabad gyököket termelnek spontán végbemenő kémiai reakciók során. Elektronszerkezetüket tekintve átmenetet képeznek a legoxidáltabb állapotú dioxigén és a legredukáltabb állapotú víz között. Az ROF legfontosabb fajtáit mutatja be az 1. táblázat. A nagy reakcióképesség azonban relatív fogalom. A szuperoxid gyök és a nitrogén-monoxid gyök kevésbé aktív, míg a hidroxil gyök szinte bármivel azonnal reagál. A többi származék reakcióképessége átmeneti (Darley-USmar *et al.* 1995). Agresszivitásukból kifolyólag az oxigén szabad gyökök károsíthatják az életfontosságú makromolekulákat: lipideket, fehérjéket, nukleinsavakat, ezért a növényekben számos antioxidáns áll rendelkezésre méregtelenítésükhöz.

1. táblázat. Az oxigén részlegesen redukált aktív származékai.

Szabad gyök	Molekula
szuperoxid, $O_2^{\bullet -}$	hidrogén-peroxid, H_2O_2
hidroxil, OH^{\bullet}	hipoklórossav, $HOCl$
peroxil, RO_2^{\bullet}	ózon, O_3
alkoxil, RO^{\bullet}	szinglett oxigén, 1O_2
hidroperoxil, HO_2^{\bullet}	szerves peroxid, $ROOH$
nitrogén-monoxid, NO^{\bullet}	salétromossav, HNO_2
nitrogén-dioxid, NO_2^{\bullet}	dinitrogén-trioxid, N_2O_3
	dinitrogén-tetroxid, N_2O_4
	peroxi-salétromossav, $ONOOH$
	szerves peroxinitrit, $ROONO$

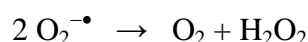
Abiotikus stressz esetében a ROF keletkezésének forrása lehet egyrészt a fotoszintetikus elektrontranszportlánc (az I. és a II. fotokémiai rendszer egyaránt) (Asada és Takahashi 1987, Asada 1999), és a légzési elektrontranszportlánc (Dat *et al.* 2000), mindkettő szuperoxid gyököt termel. A fotoszintézis másrészt a klorofillmolekulák gerjesztése során szinglett oxigén képződéséhez vezet (Asada és Takahashi 1987). Ezek a folyamatok tehát a növényi sejt egészséges működése nyomán is ROF keletkezését eredményezik. Ezen kívül a növényi sejt stressz hatására aktív módon is képes ROF előállítására. A kulcsenzimek a plazmalemmába ágyazott NADPH-oxidáz (Grant és Loake 2000, Hammond-Kosack és Jones 1996), ami szuperoxidot termel, továbbá a sejtfalban elhelyezkedő peroxidázok (Grant és Loake 2000, Hammond-Kosack és Jones 1996), a

sejtközi járatokban található amin-oxidáz (Allan és Fluhr 1997) és az oxalát-oxidáz (Dat *et al.* 2000), amelyek aktivitása következtében hidrogén-peroxid halmozódik fel a sejtközi térben. Fontos megemlíteni, hogy egyre több eredmény mutat a ROF kulcsfontosságú szerepére különböző jelátviteli folyamatokban (Foyer és Noctor 2005). A ROF anyagcseréjének összetettségét azonban nem csak lehetséges képződésük sokféleségében látjuk, hanem még inkább a ROF semlegesítésére szolgáló antioxidánsok széles körének szinte minden sejtalkotóra kiterjedő jelenlétében.

2.1.2. A növények antioxidáns védelmi rendszere

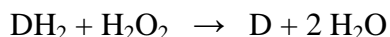
A környezeti változások elviseléséhez és a kórokozók támadása elleni eredményes védekezéshez elengedhetetlen a növényi anyagcsere rugalmassága és dinamizmusa. A stresszhelyzetekben fokozott mennyiségben keletkező ROF gyors feldolgozása szükséges az oxidatív károsodás kivédéséhez. A sejten belüli mikrokörnyezetben a ROF életidejét az antioxidáns rendszer határozza meg, amit számos enzim és alacsony molekulású vegyület alkot (Noctor és Foyer 1998).

A reaktív oxigénformák elleni védelem első vonalát a citoszólban, peroxiszómákban és kloroplasztiszokban lokalizált **szuperoxid-dizmutázok** (EC 1.15.1.1.) jelentik, melyek a következő reakcióút katalízisében játszanak szerepet (Eltner 1982):



Az általuk katalizált reakció termékeként létrejött, sok szempontból központi jelentőségű hidrogén-peroxid aránylag stabil reaktív oxigénforma. Emiatt a többi ROF rövid időn belül hidrogén-peroxiddá alakul (Allan és Fluhr 1997). Elektromosan semleges és kevésbé reaktív, ezért képes áthaladni a membránokon, így keletkezési helyéről más sejtekbe vándorolhat. Semlegesítésére különböző folyamatokban, különböző enzimek hatására kerülhet sor.

A növényi **peroxidázok** (EC 1.11.1.7.) protohem prosztetikus csoportot tartalmazó, glükoprotein enzimek, melyek a következő reakciót katalizálják:



ahol DH_2 az elektrondonor, melyre a legtöbb növényi peroxidáz (POX) kevésbé specifikus: *in vivo* többek között különböző fenolokat, fenolszármazékokat oxidálnak, *in vitro* aktivitás-mérésekhez pedig számos vegyület alkalmazható, például a gvajakol vagy a pirogallol. A legszélesebb körben alkalmazott vegyület miatt gvajakol-peroxidáznak is nevezik az ebbe a csoportba tartozó enzimeket. Számos élettani funkciójuk ismert (Asada 1992), többek között részt vesznek a lignin bioszintézisében (Gross 1978), az etilén képződésében, az indol-ecetsav bomlásában (Salin 1987). Jelentős szerepük van az öregedési folyamatokban (Wyen *et al.* 1971). Megtalálhatóak a vakuólumban, a sejt falban, a citoszólban és az apoplastban; a sejtszervecskében viszont – így többek között a kloroplasztiszban – nem. Sejtvédő hatásuk elsősorban az enzimreakció során

létrejött oxidált termékek élettani szerepében rejlik (Asada 1992), de nem zárható ki a H_2O_2 semlegesítésének jelentősége sem. A POX aktivitásának megemelkedése általános válasz szinte valamennyi stresszhatás esetében, mint pl. az alacsony hőmérsékletre, különböző xenobiotikumokra, a növényi kórokozók fertőzésére, a levegőszennyezésre, vagy a talaj megnövekedett nehézfém-tartalmára (Hegedűs *et al.* 1997, Rabe és Kreeb 1979, Van Assche és Clijsters 1990).

A **kataláz** (EC 1.11.1.6.) négy alegységből álló, hem prosztetikus csoportot tartalmazó enzim, mely a hidrogén-peroxid hidrogéndonor nélküli bontását katalizálja:



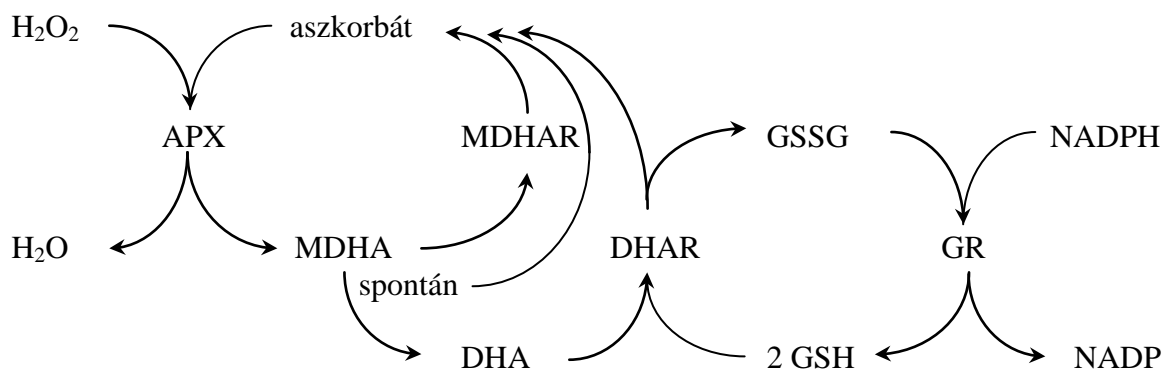
A katalizált reakció sebessége meglehetősen nagy, viszont a kataláz szubsztrátaffinitása kicsi (Willekens *et al.* 1995). A kataláz az egyik legjelentősebb hidrogén-peroxidot semlegesítő enzim a növényekben, amely a peroxiszómákban, a glioxiszómákban és – kukorica esetében – a mitokondriumokban található (Salin 1987, Scandalios 1990, Willekens *et al.* 1997). A kataláz, kompartmentalizációja következtében, elsősorban a fotorespiráció során képződő hidrogén-peroxid semlegesítésében játszhat elsődleges szerepet, jóllehet a hidrogén-peroxid a membránokon általi diffúzióval a sejt legkülönbözőbb részeibe könnyen eljut (Willekens *et al.* 1997).

Az **aszkorbinsav-peroxidáz** (EC 1.11.1.11.) protohem prosztetikus csoportot és nem hem vasat tartalmazó enzim, mely a következő reakciót katalizálja:



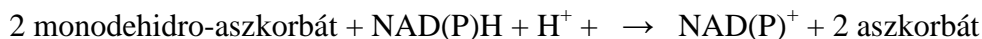
Hidrogén-peroxidra nézve nagyobb affinitással rendelkezik, mint a kataláz. Az APX aminosav-sorrendje és más molekuláris tulajdonságai alapján jól elkülönül a klasszikus növényi peroxidázoktól (Asada 1992, Mehlhorn *et al.* 1996). Az aszkorbinsav-peroxidáz a növényekre és algákra jellemző enzim, amely a kloroplasztiszt és a többi sejtalkotót védi a hidrogén-peroxid és más ROF károsító hatásától. Az enzim alacsony pH optimuma arra enged következtetni, hogy a sejt savas részeiben működik leghatékonyabban, így pl. a vakuólumban, illetve az apoplastikus térben (Asada 1992). Az APX izoenzimek aktivitása kimutatható a kloroplasztiszban, a citoplazmában és az apoplastban. A kloroplasztidiális izoenzimnek tilakoidhoz kötött és sztrómában oldott formája létezik (Chen és Asada 1989, Grace *et al.* 1995). A kloroplasztiszban kimutatható izoenzimjei elektrondonorként szinte kizárólag az aszkorbinsavat fogadják el, aszkorbinsavmentes közegben rövid élettartamúak, ellentétben a citoplazmatikus izoenzimekkel, amelyek például a pirogallolt is képesek oxidálni (Asada 1992).

A növényekben képződő ROF kordában tartására szakosodott **aszkorbát–glutation ciklus** (2. ábra) első eleme tehát a hidrogén-peroxidot semlegesítő APX.



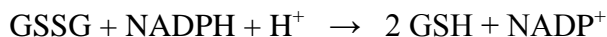
2. ábra. Az aszkorbát–glutation ciklus (vagy Halliwell–Asada ciklus) növényekben.

Az APX enzim működése során az aszkorbinsav monodehidro-aszkorbáttá (MDHA) oxidálódik. Ez viszonylag kevésbé reakcióképes, rövid életidejű szabad gyök, spontán diszproporcionálódik aszkorbáttá és dehidroaszkorbáttá (DHA), vagy a tilakoidmembránban **monodehidro-aszkorbát-reduktáz** enzim (EC 1.6.5.4; MDHAR) által katalizált folyamat során aszkorbinsavvá redukálódik:



MDHAR aktivitás megfigyelhető több sejtalkotóban is mint a kloroplasztiszok, a citoszól, mitokondriumok, glioxiszómák és levél peroxiszómák. (Leterrier *et al.* 2005)

Az oxidált dehidroaszkorbinsavból (DHA) a **dehidroaszkorbát-reduktáz** enzim (EC 1.8.5.1; DHAR) hatására, redukált glutation terhére regenerálódik az aszkorbinsav. A glutationt az aszkorbát–glutation ciklusban a **glutation-reduktáz** enzim (EC 1.6.4.2) redukálja NADPH felhasználásával (Alscher *et al.* 1997):



Az aszkorbát–glutation ciklusban fontos szerepet játszó glutation-reduktáz (GR) enzim aktivitásának stressz hatására történő növekedését számos esetben leírták (Clijsters *et al.* 1999, Noctor *et al.* 1998), ugyanakkor annak csökkenését (Gallego *et al.* 1996) és változatlanságát (Wingsle *et al.* 1992) is tapasztalták bizonyos esetekben. Az enzim fokozottabb aktivitása számos oxidatív stresszel szemben nagyobb ellenállóságot biztosít (Foyer *et al.* 1995), ugyanakkor az is bizonyított, hogy magasabb GR aktivitás és az annak hatására megnövekedett GSH/GSSG arány önmagában nem képes a stresszel szembeni ellenállóság javítására, csak abban az esetben, ha más antioxidáns hatású enzimek (pl. SOD) aktivitása is fokozódik (Malan *et al.* 1990). Az aszkorbát–glutation ciklus enzimeit először a kloroplasztiszban mutatták ki, jóllehet jelen vannak mind a fotoszintetizáló, mind a nem fotoszintetizáló szövetek citoplazmájában és különböző sejtszervecskéiben is (Foyer 1993).

A ciklus alacsony molekulasúlyú nem-enzimikus antioxidánsainak (**aszkorbinsav** és **glutation**) szerepét hangsúlyozza Noctor és Foyer szemleci (1998). A növények antioxidáns

kapacitásának megítélésénél nem csupán a vegyületek teljes kimutatható mennyisége, hanem az aszkorbát és glutation „pool” oxidációs szintje, azaz redukáló kapacitása is lényeges információ.

Az aszkorbát–glutacion ciklus enzimein kívül a növények antioxidáns hatású védelmi rendszeréhez tartoznak még a **glutacion-S-transzferázok** (EC 2.5.1.18; GST), olyan citoplazmatikus enzimek, amelyek a glutacion tripeptid konjugációját katalizálják különböző hidrofób, a sejtekre nézve mérgező szubsztátokkal (Mannervik és Danielson 1988). A glutacion-konjugátumokat a növény kiválaszthatja a vakuólumba vagy az apoplastba. Néhány GST glutacion-peroxidázként is működik, így közvetlen védőhatást fejt ki oly módon, hogy a szerves peroxidok inaktiválódását katalizálja glutacion-diszulfid létrehozásával (Bartling *et al.* 1993), valamint a GSH-szint növelésével visszacsatolós szabályozás révén. A megnövekedett glutationszint különböző védőhatású gének (például: fitoalexin, GST-k bioszintézisének génjei) átíródását is indukálja (Wingate *et al.* 1988). A legtöbb növényi GST nehézfémstressz, etilénkezelés, növénykórokozók elleni stressz-válasz, sebzés vagy ózon hatására indukálódik, amiből arra következtettek, hogy szerepüket az oxidatív stressz elleni védekező mechanizmus részeként kell értékelni (Marrs 1996). Transzkripciójának serkentésében az elsődleges szignál szerepét a hidrogén-peroxid játssza. Az oxidatív stressz kivédésén kívül fontos feladataik vannak a sejt számos anyagcsere folyamatában: például az antociánok képződésében és az auxinok aktivitásának szabályozásában, sejten belüli transzportjukban (Alfenito *et al.* 1998, Marrs 1996).

2.1.3. Az oxidatív stressztűrés alakulása a növények élettani állapotának függvényében

Az öregedés folyamán általában csökken a növények antioxidáns kapacitása, így oxidatív stressz-ellenállósága is (Ádám *et al.* 1995). A növényi szövetek öregedése (szeneszcenciája), ami végső soron a sejtek halálához vezet, fokozza az abiotikus stresszorok károsító hatását, valamint kedvez a nekrotróf kórokozók támadásának (Barna *et al.* 1985, 2003a). Ennek oka az, hogy az öregedő szövetek kevésbé ellenállóak a nekrotróf kórokozók által termelt toxinokkal, sejtfal- és membránbontó enzimekkel és a membránlipidek autólízisével szemben (Barna és Györgyi 1992). A szeneszcens sejtek membránjaiban a szabad szterol/poláris lipid (elsősorban foszfo- és galaktolipid) arány megemelkedik, a membránok merevebbé, kevésbé ellenállóvá válnak (Barna *et al.* 1993, 1995). A növények fiatal szöveire, illetve az olyan *in vitro*-szelektált vagy transzgenikus növényekre, melyek fokozott juvenilitást mutatnak, jellemző a megemelkedett enzimatis és nem-enzimatis antioxidáns aktivitás, s ez párhuzamban áll különféle eredetű, ROF-felhalmozódást eredményező oxidatív stresszel szembeni fokozott ellenálló-képességgel (Barna *et al.* 1993, 2003a, Dertinger *et al.* 2003). Itt érdemes megemlítenünk a kereszttolerancia jelenségét, azaz a tényt, hogy ha egy bizonyos stresszre tolerancia alakul ki a növényben, akkor az további, egyéb stresszorokkal szemben is nagyobb ellenálló-képességet fog mutatni (Pastori és Foyer 2002, Shaaltiel *et al.* 1988).

Ha a legveszélyesebb reaktív oxigénforma, a hidroxil gyök képződése gátolt, akkor a környezeti eredetű stressz vagy a kórokozó támadása során bekövetkező szöveti károsodás is mérséklődik (Deák *et al.* 1999, Hegedűs *et al.* 2008). A szövetek öregedését mesterségesen lassíthatjuk is. Így a növény juvenilitását növeli a fokozott nitrát nitrogén dózisok alkalmazása, a csúcsrügy eltávolítása, vagy citokininekkel való kezelése, illetve olyan gének beépítése a genomba, melyek a juvenilitás fokozásán keresztül vagy közvetlenül növelik az antioxidánsok szintjét a növényben (Hegedűs *et al.* 2004). A szenescencia ezeken a módokon történő lassítása, az előbb említett biokémiai/élettani változások előidézésével növeli az ellenállóságot a nektrózist okozó kórokozók és abiotikus stresszorokkal szemben (Ádám *et al.* 1990, Allen *et al.* 1997, Barna *et al.* 1997, Deák *et al.* 1999, Horváth *et al.* 1999, Székács *et al.* 2000). Fontos azonban megemlítenünk, hogy a juvenilitás fokozása elsősorban a sejtek elhalását, a nektrózis kialakulását gátolja, és csak ezen keresztül hat a kórokozóra.

2.2. Abiotikus stressz

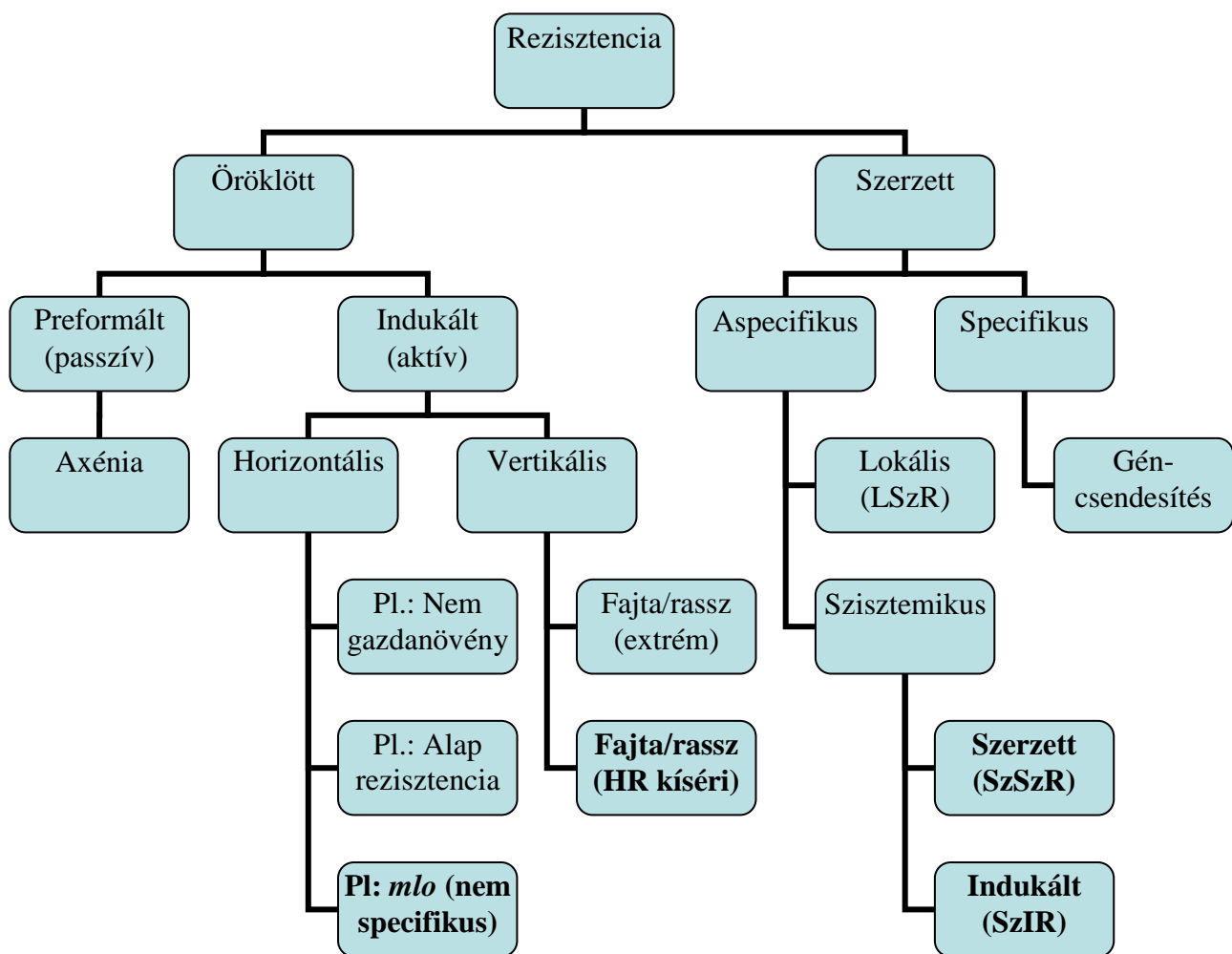
Az abiotikus eredetű stressz előidézésére egy jellemző példa a **nehézfémek** okozta oxidatív károsodás. A különböző emberi tevékenységek hatására világszerte jelentősen növekedett az elmúlt évtizedekben az ipari körzetek és városok talajának nehézfém-tartalma (Kádár 1993). Széles körben vizsgálták a nehézfémek hatását a különböző anyagcsere folyamatokra, különös tekintettel a fotoszintézisre (Krupa és Baszynski 1995, Láng *et al.* 1998). Általánosságban elmondható, hogy károsítják a membránokat, gátolják a klorofill bioszintézisét, továbbá a fotoszintézis sötét- és fényszakaszában végbemenő reakciókat, mivel kölcsönhatásba lépnek az elektrontranszportlánc komponenseivel és (vagy) befolyásolják a Calvin-ciklus enzimeinek szerkezetét és funkcióját. A nehézfémek több enzim aktivitását csökkentik, ami különféle okokból alakulhat ki. Okozhatja a fém közvetlen gátló hatása, de más folyamatok (pl. az oxidatív stressz körülményei között létrejött változások) közvetett hatása is (Clijsters *et al.* 1999, Hegedűs *et al.* 2001, Sanità di Toppi és Gabbrielli 1999). Ennek eredményeképpen megemelkedett H₂O₂-képződés és lipid-peroxidáció tapasztalható mind a levelekben, mind a gyökerekben.

A **sóstressz** egy másik antropogén eredetű, és sajnos az egyre nagyobb területeket érintő elsivatagosodással párhuzamosan növekvő gondot jelentő abiotikus stressz. A talaj és az öntözővíz magas só-koncentrációja egyike a száraz és félszáraz övezetek mezőgazdasági termelését legjobban veszélyeztető tényezőknek. A többlet ionok jelenléte a gyökérzónában először károsítja a növény gyökereit, majd ezt követően az ionok feldúsulnak a föld feletti növényi részekben, ami komoly károsodást jelent a növényi anyagcsere számára. Mindez végül satnya növekedéshez és csökkent terméshez vezet (Shannon 1997). A növényekben az elszikesedés és a szárazság okozta NaCl-toxicitás és a talaj alacsony vízpotenciáljának ellensúlyozására kialakult, összetett rendszerről

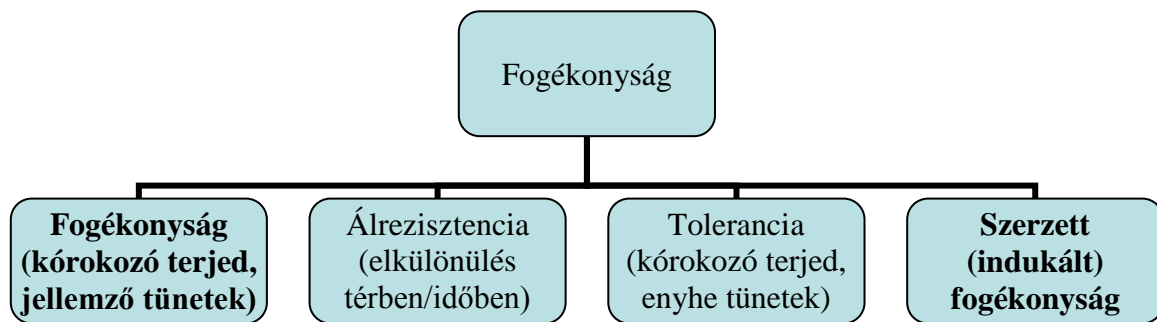
Munns és Tester (2008) szemlelikke ad áttekintést. Ezen kívül a sós talajokon termesztett növényeknek sótoleranciát biztosítani, azaz a termés kiesést csökkenteni képes a mikorrhiza és endofita gombákkal kialakított szimbiotikus kapcsolat is (Rodriguez *et al.* 2004).

2.3. Biotikus stressz: növény–kórokozó kapcsolatok

A növény–kórokozó találkozások kimenetele igen sokféle lehet, és természetesen többféle módon lehetséges ezeket osztályozni. A kutatócsoportunkban elfogadott felosztás szerint (Barna 1998) egy adott kórokozóval szemben a növény lehet ellenálló (inkompatibilis kapcsolat; ez a leggyakoribb eset), fogékony (kompatibilis kapcsolat; ez sokkal ritkábban fordul elő), vagy létrejöhet a kettő közötti számos, átmeneti típusú kapcsolat is (ezekre itt nem térünk ki). A növények kórokozókkal szembeni ellenálló-képességének (rezisztenciájának) különböző formáit a 3. ábrán bemutatottak szerint csoportosítjuk (Király és Barna 2007, Király *et al.* 2007), a fogékonyság felosztása pedig a 4. ábrán látható (Barna 1998).



3. ábra. A növényi rezisztencia (ellenállóság) típusai.



4. ábra. A növényi fogékonyság típusai.

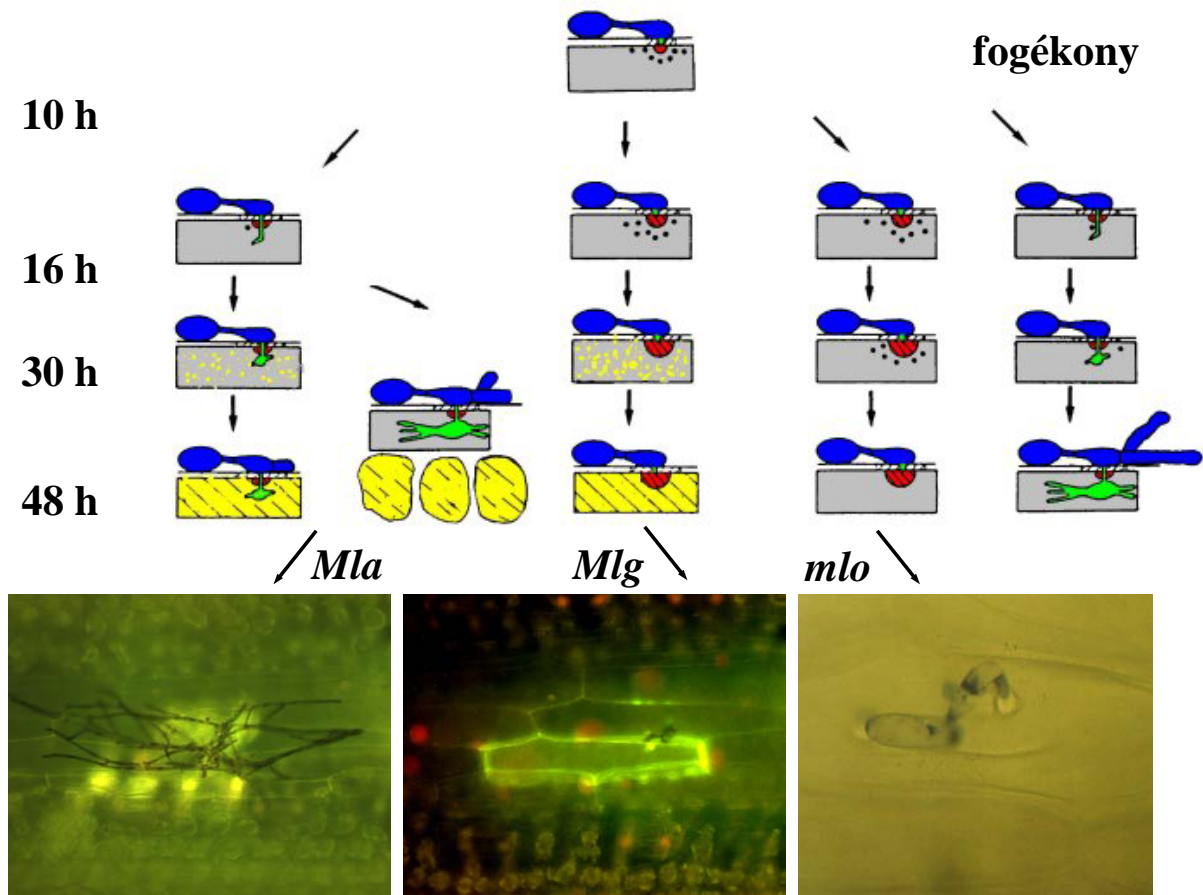
Az ábrákon vastagon szedett rezisztencia- és fogékonyság-formákkal foglalkoztam jelen dolgozatomban, így részletesen csak ezeket tárgyalom a továbbiakban.

2.3.1 Vertikális (rassz-specifikus) és horizontális (nem specifikus) öröklött rezisztencia

Az öröklött rezisztencia többféle típusa is előfordul pl. a termesztett árpafajtákban az árpa lisztharmatos betegségét kialakító *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Bgh) gombával szemben. E biotróf kórokozó az élő, sőt, minél fiatalabb növényi szöveteket kedveli, ezeken tud megfelelően növekedni és szaporodni. A kísérleteinkben használt Bgh A6-os rasszával szemben rassz-specifikus (vertikális) rezisztenciát alakít ki árpában az *Mla12* és az *Mlg* gén, míg az *Mlo* gén recesszív *mlo5*-ös allélje széleskörű (nem rassz- és fajtaspecifikus, tehát horizontális) rezisztenciát kölcsönöz évtizedek óta árpának az A6-oson túl is, szinte valamennyi lisztharmat-izolátum ellen (Heitefuss 2001). E gének a gomba fejlődésének különböző szakaszait gátolják az árpalevélen, fenotípusosan is elkülöníthető módon. Hatékony *Mla* allélek működése következtében a gomba behatolási pontján epidermisz sejtelhalás, vagy az alatta lévő mezofill sejtekre kiterjedő, szemmel is látható elhalásokat eredményező túlérzékenységi reakció (HR: *hypersensitive reaction*) alakul ki a gomba feltartóztatására. Az *Mlg* gén hatására csupán magát a megfertőzött epidermális sejtet érintő, mikroszkopikus HR alakul ki. Az *mlo5* allél viszont még a megtámadott sejtet is életben hagyva, egy hatékony papilla fejlesztésével gátolja a gomba fejlődését (Hückelhoven és Kogel 1998, Hückelhoven *et al.* 1999). A fogékony árpa epidermiszén azonban a csíratömlőt hajtó lisztharmatspóra apresszóriumot fejleszt, be tud hatolni a sejtbe, ahol létrehozza a tápanyagok felvételéhez szükséges hausztóriumot, valamint a növény felszínén növekedve beborítja azt hífáival (5. ábra).

Az inkompatibilis kórokozók támadására a növények egyik legkorábbi válasza az előzőekben tárgyalt ROF felhalmozása, mint pl. a szuperoxid ($O_2^{\bullet-}$) és a hidrogén peroxid (H_2O_2). A lisztharmat-fertőzés hatására specifikus festéssel és mikroszkóppal kimutatható korai, erős H_2O_2 -

felhalmozódás tapasztalható az Mla-, Mlg- and mlo-típusú rezisztens árpában, a fogékony növényekben viszont nem (Hückelhoven *et al.* 1999). A ROF mennyiségi meghatározása és az azokat egyensúlyban tartó antioxidánsok alakulásának vizsgálata a különböző rezisztens árpavonalakban és a fogékony fajtában volt dolgozatom egyik témája.



5. ábra. Árpa rezisztencia-típusok árpa lisztharmattal szemben Hückelhoven és munkatársai rajza alapján (1999). A fényképeken az Mla és Mlg árpa HR során elhalt sejtjei autofluoreszkálnak ibolyántúli (UV) fényben, míg az *mlo* rezisztenciagént hordozó árpa epidermális sejtjében papillaképződést figyelhetünk meg látható fényben.

2.3.2. Szisztémikus szerzett rezisztencia

A növények sokszor szisztémikus, az egész növényre kiterjedő választ adnak a lokális fertőzésekre, s ez széles spektrumú, hetekig, hónapokig fennálló rezisztenciához vezet vírusok, baktériumok és gombák ellen egyaránt (Ryals *et al.* 1996). Az első fertőzés hatására fejlődik ki, és az utána bekövetkező újabb fertőzések ellen fejt ki hatását az indukálódott rezisztencia (Kuc 1982). Mivel az egész növényi testben kialakul a rezisztencia, az indukált betegség-ellenállóság eme formáját szisztémikus szerzett rezisztenciának (SzSzR) nevezzük. Érdekessége, hogy a különböző kórokozók okozta fertőzések ugyanazt a típusú rezisztenciát idézik elő, ami azt sugallja, hogy a sokféle felismerési reakció egy közös útra terelődik a növényi válasz kialakulása során (Dangl és Holub 1997, Ryals *et al.* 1996). Az SzSzR jelensége szoros kapcsolatban áll a szalicilsav szintjének emelkedésével és a kórfolyamat-függő (*pathogenesis-related*) fehérjék felhalmozódásával (Van Loon 1997).

Rezisztens dohánynövényekben, mint például a túlérzékenységi válaszáért felelős *N* gént hordozó *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi-nc fajtában, a dohány mozaik vírus (*Tobacco mosaic virus*, TMV) lokalizált fertőzést okoz. A Xanthi-nc növényegyedek vírussal inokulált leveleiben a koordinált, programozott sejthalált a vírus szaporodásának a fertőzés helyét körülvevő kis területekre korlátozódása (léziók) és SzSzR kialakulása kíséri. A Xanthi-nc dohány elsődleges TMV-fertőződése fokozza egy második TMV-támadással szembeni lokalizációs választ, aminek következtében az elsődleges fertőzéshez képest távolabb (feljebb) elhelyezkedő leveleken fertőzés után kevesebb és kisebb kiterjedésű lézió jelenik meg (Ross 1961). A SzSzR kialakulása a TMV-fertőzés hatására helyileg és szisztémikusan keletkező szalicilsav felhalmozódásától függ (Malamy *et al.* 1990, Metraux *et al.* 1990). Kutatócsoportunk korábbi eredményei szerint az antioxidánsok fokozott aktivitása is hozzájárul a SzSzR során a nekrotikus tünetek visszaszorításához (Fodor *et al.* 1997, Király *et al.* 2008). Érdeemes megemlíteni, hogy a szalicilsav ezen kívül a növények abiotikus stressztűrő-képességének fokozásában is szerepet játszik (Janda *et al.* 2007a).

A bakteriális eredetű *nahG* gént kifejező transzgenikus Xanthi-nc dohánynövények (továbbiakban: NahG) csökkent mennyiségű szalicilsavat tartalmaznak, mivel ez a gén szalicilát-hidroxiláz enzimet kódol, ami a szalicilsavat katekollá alakítja (Gaffney *et al.* 1993). Ezekben a transzgenikus növényekben a *nahG* gén folyamatos kifejeződése elegendő a SzSzR-válasz megszüntetésére. A NahG dohánynövények a TMV-fertőzéssel szemben érzékenyebbek, és a vad típusú Xanthi-nc növényekhez képest nagyobb terjedelmű nekrotikus területekkel reagálnak jelezvén, hogy a szalicilsav fokozott termelése alapvetően szükséges a TMV-vel szembeni rezisztenciában (Delaney *et al.* 1994). A Xanthi-nc és NahG dohánynövények TMV-fertőzésre adott metabolikus válaszána összehasonlító elemzése hozzájárulhat ahhoz, hogy a szalicilsavnak a TMV-indukálta SzSzR-jában játszott hatásmechanizmusát jobban megértsük.

2.3.3. Szisztémikus indukált rezisztencia

Endofita arbuszkuláris mikorrhiza gombákkal kialakult szimbiózis a gazdanövények számára bizonyos fokú védelmet nyújt a kedvezőtlen környezeti tényezők okozta stresszel szemben (Newman és Reddell 1987). A kölcsönösen kedvező kapcsolat továbbá képes szisztémikus indukált rezisztenciát kialakítani a növényben kórokozók támadása ellen. Nemrég egy gyökér endofita bazídiumos gomba, a *Piriformospora indica* esetében mutatták ki, hogy fokozza az árpa ellenálló-képességét gyökér- és levélbetegségek ellen, valamint csökkenti enyhe sóstressz károsító hatását (Waller *et al.* 2005). A növény metabolikus aktivitásának és antioxidáns rendszerének az endofita általi indukálása és a gazdanövényben kialakult szisztémikus indukált rezisztencia összefüggéseit vizsgáltuk munkánk következő szakaszában.

2.3.4. Szerzett fogékonyság

Annak ellenére, hogy a kereszttolerancia jelenségével kapcsolatban elmondható, hogy egy elsődleges, enyhébb mértékű stressz általában ellenállóvá teszi a növényt egy második stresszel szemben, bizonyos esetekben ennek fordítottja is lehetséges. Ha a növényt elsőként érő stressz túlzott mértékű, illetve ha a második stresszhatás támadása előtt a növénynek nincs ideje kiheverni az elsőből eredő károsodást, azaz nem tud anyagcsere-útjainak módosításával alkalmazkodni, akkor pl. egy adott kórokozóra rezisztens növény is fogékonnyá válhat. Korábban ezt a jelenséget prediszpozíciónak hívták.

Az árpa lisztharmatra fogékony 'Ingrid' árpafajtában, valamint annak különböző rezisztenciaformákat kialakító génekkel rendelkező, közel-izogén vonalainak (Mla, Mlg, mlo) egyedeiben egy előzetes hősokk-kezelés fokozza a fogékonyságot, illetve letöri a rezisztenciát és fogékonyságot indukál a *Bgh* lisztharmat gombával szemben (Barna *et al.* 2003b). Ez a jelenség a nem rassz-specifikus, széles spektrumú rezisztenciát kódoló *mlo* rezisztenciagént hordozó árpavonal esetében a leginkább meglepő, így elsőként ebben a vonalban igyekeztünk utána járni a folyamat hátterében húzódó, génkifejeződés szintű változásoknak.

3. A MEGOLDANDÓ FELADATOK ISMERTETÉSE

„Témát lehet adni és kapni. A téma adódik. Kialakulhat. Létrejöhet és beindulhat. A témával kapcsolatban minden mozgásforma lehetséges, csak éppen a választás lehetősége kizárt.”

Dévényi Tibor, biokémikus (1927–2003)

Témaválasztásom (Dévényi 1975) során az alábbi megoldandó feladatokkal szembesültem:

3.1. Munkánk egyik céljául tűztük ki dohánynövények élettani állapota (juvenilitása vagy szenescenciája) és abiotikus eredetű oxidatív stresszel – nehézfémekkel (higany-klorid), valamint külsőleg adagolt hidrogén-peroxiddal – szembeni ellenálló-képessége közötti összefüggés tanulmányozását.

3.2 Összehasonlítottuk a TMV-fertőzésre adott anyagcsere választ (metabolikus aktivitás, lipid-peroxidáció, lipid-összetétel) Xanthi-nc dohányban és annak szalicilsav-felhalmozásban gátolt transzgenikus vonalában (NahG), mely utóbbiban a TMV-fertőzés hatására nem alakul ki SzSzR.

3.3. A lisztharmat-fertőzést kísérő H_2O_2 -felhalmozódás mennyiségi meghatározásával párhuzamosan célunk volt az antioxidánsok alakulásának vizsgálata fogékony Ingrid árpafajtában, valamint annak különféle rezisztencia-géneket hordozó, közel-izogén vonalaiban. Továbbá arra kerestük a választ, hogy a különböző mértékű ROF-felhalmozás vajon összefügg-e a fertőzést kísérő membránkárosodással és etiléntermeléssel.

3.4. A *Piriformospora indica* gyökér endofita gomba által árpában indukált sótűrés biokémiai hátterét kutattuk. Élettani „stressz-jelzőkkel” (anyagcsere aktivitás, zsírsav-összetétel, lipid-peroxidáció) kívántuk jellemezni sótűrő és sóérzékeny árpafajta válaszát erős sóstresszre, *P. indica*-val szimbiózisban vagy a nélkül.

3.5. Hősokk-kezeléssel indukált lisztharmat-fogékonyságot tanulmányoztuk *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*-rezisztens mlo árpavonalon. A tünetmentes rezisztenciával rendelkező mlo árpán alkalmazott hőkezelés és/vagy fertőzés után RT-PCR-módszerrel vizsgáltuk különböző, a növényi védekezési folyamatokban szerepet játszó gének kifejeződésében a változásokat.

4. ANYAG ÉS MÓDSZER

4.1. Kísérleti alanyok

4.1.1. Dohány

Kísérleteinkhez az alábbi dohányfajtákat és -vonalakat neveltük talajban, két alkalommal áttűzdelve, üvegházi körülmények között (rendszerint 18–26°C hőmérsékleten, 60% relatív páratartalom mellett, naponta 16 órányi, legalább 15.000 lux fénynél), a kezelés és/vagy mintavétel időpontjáig, összehasonlító vizsgálat alá vetve a következő párosításokat:

a) *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun dohányfajta öregebb (alulról az ötödik) és fiatalabb (alulról a tizedik, azaz a legfelső teljesen kifejtett) levelei.

b) *Nicotiana tabacum* L. cv. Petit Havana SR1 (a továbbiakban SR1) és citokinin-túltermelő transzgenikus CTKm vonala. Itt mindkét dohányvonalnál öregebb (alulról az ötödik) leveleket használtuk a kísérletekben. A CTKm dohányt az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetében állították elő, mégpedig a CaMVp35S-ipt gént *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 (pMP90RK) törzsével való transzformálás útján vitték be SR1 dohányba.

c) *Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi-nc dohány (a továbbiakban Xanthi), ami a *Nicotiana glutinosa* dohányból származó *N* gén révén rezisztens a TMV-vel szemben, és szalicilsavat felhalmozni nem képes transzgenikus NahG vonala. A NOVARTIS Mezőgazdasági Biotechnológiai Központja (Research Triangle Park, NC, USA) volt szíves rendelkezésünkre bocsátani a Xanthi dohány genetikai transzformációjával előállított transzgenikus Xanthi-nc/NahG-10 dohánytörzsét (a továbbiakban NahG).

4.1.2. Árpa

Az árpa liztharmattal végzett kísérletekhez használt Ingrid árpafajta (*Hordeum vulgare* cv. Ingrid) és visszakeresztezéssel előállított, közel-izogén vonalai (Ingrid Mla12, Ingrid Mlg és Ingrid mlo5) Kølster és munkatársai nemesítő munkáját dicséri (1986). Lisa Munktól, a Koppenhágai Egyetem (Dánia) gyűjteményéből hozzánk a Giesseni Egyetem Növénykórtani Intézetével (Németország) való együttműködésünk keretében jutott el. Növényeinket üvegházi körülmények között (lásd: 4.1.1. fejezet), előzetesen sterilizált talajban neveltük, a vizsgálatokhoz minden esetben az első, azaz legalsó leveleket használtuk.

A sóstresszel kapcsolatos vizsgálatok során sóérzékeny 'Ingrid' árpát hasonlítottunk össze sótűrő 'California Mariout' árpafajtaival (Epstein *et al.* 1980). Az árpa szemtermések felületi fertőtlenítéséhez 10 percre 0,25% Na-hipoklorit oldatba áztattuk azokat, steril vízzel öblítettük, majd 22°C-on csíráztattuk félsteril körülmények között (szűrőpapíron, Petri-csészében). Két nap

után a csíranövénykéik egyik felét cserepekbe ültettük 2:1 arányú puffasztott agyag (Seramis, Masterfoods, Verden, Németország) és Oil-Dri (megfelelője: Terra Green, Damolin, Mettmann, Németország) keverékébe. Fitotronban neveltük a növényeket 22/18°C nappali/éjszakai hőmérsékleten, 60% relatív páratartalom mellett és 16 órás nappalhosszon (200 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fotonfluxus sűrűség), heti rendszerességű tápanyag-utánpótlással 0,1% Wuxal top N oldattal (Schering, Düsseldorf, Németország, N:P:K=12:4:6).

4.2. Szimbiotikus kezelés

A fenti (4.1.2.) módon csíráztatott 'Ingrid' és 'California Mariout' szemtermések másik felét kezeltük *Piriformospora indica* gyökér endofita gombával: a kétnapos csírák gyökerét steril desztillált vízzel homogenált micélium-szuszpenzióba mártottuk, mielőtt cserepekbe ültettük volna az előző fejezetben leírt körülmények között.

A *P. indica* gombát folyékony *Aspergillus* minimál-tápoldatban (Peškan-Berghöfer *et al.* 2004) szaporítottuk föl. A gombamicélium mosása és a micélium-szuszpenzió elkészítése Druege és munkatársai (2007) leírása alapján történt. A gyökerek gyarmatosításának mértékét egy hetes növények 1 cm hosszú gyökérszakaszain állapítottuk meg (McGonigle *et al.* 1990) Zeiss Axioplan 2 típusú mikroszkóppal, miután a gyökérszakaszokat 0,01% (w/v) savas fukszinnal laktoglicerinben megfestettük (Kormanik és McGraw 1982).

4.3. Abiotikus stresszorok

4.3.1. Higany-klorid kezelés

'Samsun' dohány öreg és fiatal leveleit (lásd: 4.1.1. fejezet) az ép növényen kezeltük 0,01%-os higany-klorid oldattal: a levelek felületére ecsettel kentük föl az oldatot. 24 óra elteltével dugófúróval mintát vettünk a kezelt levelekből, ismétlésenként 3 db 20 mm átmérőjű levélkorongot desztillált vizes leöblítés után 40 ml desztillált vízre helyeztünk és szobahőmérsékleten inkubáltuk. A kontroll mintákhoz álkezelt (vízzel beecsetelt) levelekből vágunk levélkorongokat.

4.3.2. Hidrogén-peroxid kezelés

'Samsun' dohány öreg és fiatal leveleit hidrogén-peroxid okozta közvetlen oxidatív stressznek tettük ki külsőleg az alábbi módon: mintánként 8 db, egyenként 9 mm átmérőjű levélkorongot vágunk ki ép levelekből dugófúróval, és 40–40 ml, különböző töménységű hidrogén-peroxid oldatra (50 mM, 100 mM, 200 mM) helyeztük. A kontroll mintákat 40 ml desztillált vízben úsztattuk. Az SR1 és CTKm dohánylevelek H_2O_2 -tűrő képességét csak egy koncentrációnál, 100 mM-os töménységű oldatokon vizsgáltuk, ugyanilyen módon.

4.3.3. Sóstressz

P. indica-val kolonizált és kontroll 'Ingrid' illetve 'California Mariout' árpat sókezelésnek vetettünk alá: három hetes koruktól fogva 2 héten keresztül folyamatosan alulról öntöztük őket 100 vagy 300 mM-os steril NaCl-oldattal. A kontroll növényeket steril vízzel öntöztük.

4.3.4. Hő sokk

Hőkezelést 7 napos 'Ingrid', Mla, Mlg és mlo árpan hajtottuk végre úgy, hogy a növények föld feletti részét 45 másodpercre 49°C-os vízfürdőbe mártottuk (fejjel lefelé belógatva). A növények egy részét 24 órával később fertőztük árpa lisztharmattal a 4.4.2. bekezdésben leírt módon.

4.4. Biotikus stresszorok

4.4.1. Dohány mozaik vírus

TMV-rezisztens Xanthi és szalicilsav-hiányos, transzgenikus NahG dohánynövényeket lokális nekrotikus léziókat (HR) kiváltó kórokozóval, a dohány mozaik vírus (TMV: *Tobacco mosaic virus*) U1-es törzsével fertőztük. A vírustörzs fenntartása a TMV-re fogékony 'Samsun' dohányfajtan történt, szintén üvegházban, a fertőzéshez a jellemző mozaikos tüneteket mutató leveleket (1 g levél 10 ml vízben) dörzsmozsárban homogenáltuk, és a kapott szuszpenziót kézzel (abrazívum nélkül) a levélfelületre dörzsöltük. Kontrollként vízzel bedörzsölve álfertőztünk másik növényeket. Az első fertőzés alulról a 3. és 4. leveleken történt nyolc hetes növényeken. A második fertőzés 14 nappal később a felsőbb leveleken (5. és 6. pozícióban a hipokotil fölött) történt (2. táblázat). Valamennyi mérést 10 hetes növények felső, 5. és 6. valódi leveleiből vett mintán végeztük.

2. táblázat. Fertőzési elrendezés. Nyolc hetes dohánynövények alulról 3. és 4. leveleit fertőztük TMV-vel vagy kontrollként álfertőztük (végigdörzsöltük vízzel, vírus nélkül). Az 5. és 6. leveleket két hét elteltével fertőztük.

Jelölés	Fertőzés	
	alsó leveleken	felső leveleken
TMV – –	nincs	nincs
TMV – +	nincs	TMV
TMV + +	TMV	TMV

4.4.2. Árpa lisztharmat

Az árpa lisztharmatos betegsége kórokozójának (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei* A6-os rassz) fenntartására fitotronban elkülönített fogékony 'Ingrid' árpafajtát vettünk igénybe. A fertőzést saját készítésű fertőzőtoronyban (üres kartonpapír dobozban) végeztük. Lisztharmattal az árpanövényeket 7 napos korukban fertőztük a bőségesen sporuláló lisztharmattlepek erőteljes agitálásával (rázogatásával), majd a fertőzőtorony által behatárolt térben légkeverés (legyezgetés) útján egyenletes borítottságot alakítottunk ki az elsődleges leveleken.

4.5. Membránkárosodás vizsgálata

4.5.1. Elektrolit-kiáramlás mérése konduktométerrel

A növényi sejthártyák öregedés, stressz vagy betegség okozta oxidatív károsodását, és az ezzel járó áteresztő-képesség növekedést a sejtekből kiáramló elektrolitok mennyisége alapján határoztuk meg (Ádám *et al.* 2000, Barna *et al.* 1993). A levelek középső részéből kivágott levél-szeleteket (árpa esetében) illetve levélkorongokat (dohány estében) Petri-csészébe, 40 ml kétszer desztillált vízre helyeztük úsztatás végett. A levéldarabkákat inkubáló oldat vezetőképességét különböző időpontokban mértük Oakton Benchtop Meter pH/Con 510 (Oakton, Szingapúr) típusú konduktivitás-mérő készülékkel. Az adatokat a friss levéltömegre vonatkoztatott vezetőképesség-változás ($\mu\text{S/g}$ friss tömeg) mértékegységben adtuk meg.

4.5.2. Etán-termelődés kimutatása

A lipid-peroxidáció mértékére a reakcióban termelődő egyik végtermék, az etán mennyisége utal. A dohány- illetve árpalevél mintákat (kb. 400 mg) 16 ml ürtartalmú kémcsövekbe helyeztük, amiket nitrogén gázzal telítettünk, majd légmentesen lezártunk. A telítetlen ω -3 lipid-hidroperoxidok *in situ* bomlását etánná rövid hőkezeléssel serkentettük (Degousée *et al.* 1995). Szobahőmérsékletre való visszahűlés után a kémcső légtéréből 1 ml gázmintát vettünk, s azt befecskendeztük gázkromatográfba (Hewlett Packard 5890 Series II, 30 méteres GS-Alumina oszloppal), ahol standard etán gázhoz viszonyítva (Sigma-Aldrich, München, Németország) határoztuk meg mintáink etán-tartalmát. A befecskendezési hőmérséklet 120°C volt, a detektornál 150°C és a kemencében 100°C, a hordozó gáz pedig hélium volt (350 kPa).

4.6. Az etilén stresszhormon gázkromatográfiás kimutatása

Lisztharmat-fertőzött és kontroll, fertőzetlen elsődleges árpaleveleket levágtunk és 2 ml desztillált víz társaságában 25 ml ürtartalmú kémcsövekbe helyeztünk, amiket gumi zárókupakkal légmentesen lezártunk. A kémcsöveket fitotronban tartottuk állandó hőmérsékleten és fényen

(20°C, 250 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). Naponta vettünk injekciós tűvel gázmintát a kémcsövek légtéréből (alkalmanként 1 ml), 4 napon keresztül. A minták etilén-tartalmát mennyiségileg meghatároztuk gázkromatográf (Packard 427 GC) segítségével alumínium-oxid oszlopon (1 m \times 3,175 mm) láng ionizációs detektorral. Az injektor, oszlop és detektor hőmérséklet 80, 80 és 220°C volt (Heiser *et al.* 1998).

4.7. Zsírsav-összetétel meghatározása

A teljes zsírsav-tartalom kivonásához 1,5 g levélszövetet eldörzsöltünk mozsárban (0–4°C) 7 ml kloroform-metanol (1:2, v/v) elegyben (Bligh és Dyer 1959). Alapos keverést követően a homogenátumot lecentrifugáltuk (2000 g, 20 perc, 7°C), majd a felülúszót átöntöttük egy új, tiszta kémcsőbe. A lerakódott szilárd fázist újfent kivonásnak vetettük alá 2 ml kivonó-eleggyel, majd erőteljes keverés után centrifugáltuk a fentiek szerint, és a kapott felülúszókat egyesítettük. A 0,1 M KCl-dal szembeni fázis-szeparáció (Floss *et al.* 1957) után a szerves fázist nitrogén alatt szárítottuk 38°C-on. A mintákat újraszuszpendáltuk kloroformban, szilíciumsavas oszlopkromatográfiával frakcionáltuk, majd a zsírsavakat Žur és munkatársai (2002) módszere alapján metil-észtereztük.

A foszfolipidek zsírsav-összetételét gázkromatográfiás (Hewlett Packard 5890 Series II) módszerrel állapítottuk meg GS-Alumina (30 m \times 0,542 mm, J&W Scientific, Folsom, CA, USA) kapilláris oszlopokon, 200°C-os izotermális működési hőmérsékleten, hélium hordozó gázzal, 350 kPa nyomáson (Žur *et al.* 2002). Az egyes zsírsavak viszonylagos mennyiségét belső standardhoz, heptadekánsavhoz (C17:0, Sigma-Aldrich) viszonyítva határoztuk meg. A telítetlenségi mutató (*double bond index*) kiszámolásához a telítetlen zsírsavak százalékos részarányát egyenként megszoroztuk kettős kötéseik számával, majd ezeket az értékeket összeadtuk, és a végeredményt százzal osztottuk.

A szterolok meghatározásához acetiláltuk azokat acetanhidrid és piridin elegyével (2:1 v/v) 24 órán keresztül szobahőmérsékleten, majd szeparáltuk DB-1701 (15 m \times 0,254 mm, J&W Scientific) kapilláris oszlopon, 270°C hőmérsékleten, hélium hordozógázzal, 350 kPa nyomáson (Žur *et al.* 2002), kolesztán belső standardhoz viszonyítva.

4.8. Kalorimetria

Xanthi és NahG dohány második TMV-fertőzését követően a felsőbb levelek érkezeiből 5 \times 35 mm nagyságú levéldarabokat, sóstressznek kitett árpánál 5 hetes korban az elsődleges levél csúcsától számolva 4 cm hosszú darabokat vágunk kalorimetriás méréseinkhez. A Thermal Activity Monitor LKB-2277 (Thermometric, Järfälla, Svédország) mintatartó ampullájába két különböző növényről származó minta került, azt szorosan lezártuk, és 20 percen keresztül hagytuk a hőmérsékletét kiegyenlítődni mérés előtt. A hőtermelést ezután folyamatosan mértük 20 percen

keresztül, 25°C hőmérsékleten, öt ismételtsben. A maximális hőkibocsátási rátát (mW mértékegységben) a minta száraztömegére vonatkoztatva határoztuk meg.

4.9. Hidrogén-peroxid tartalom fluorimetriás meghatározása

A sejtekben felhalmozódó egyik jelentős reaktív oxigénforma, a hidrogén-peroxid mennyiségi meghatározását Lu és Higgins (1998) fluorimetriás módszere alapján végeztük. A 2',7'-diklór-fluoreszcin-diacetát (DCFH-DA) vegyület a sejtekben jelenlévő peroxidázok és H₂O₂ hatására oxidálódik, és a fluoreszcens 2',7'-diklór-fluoreszcein (DCF) keletkezik belőle. A DCFH-DA vegyületből 20 mM-os törzsoldatot készítettünk 100%-os etanollal, majd ezt közvetlenül felhasználás előtt hígítottuk 1:50 arányban a kívánt 0,4 mM-os végkoncentrációra desztillált vízzel. Egész, levágott árpalevelek sejt közötti járataiba juttattuk be az oldatot vákuumos infiltrációval. Az infiltráció után 8 perccel a leveleket (mintánként 0,1 grammot) folyékony nitrogénben lefagyasztottuk, majd 2 ml 2 mM-os KCN-oldatban eldörzsöltük előhűtött mozsárban. A mintákat lecentrifugáltuk (12.000 g, 20 perc, 4°C), a felülúszót 1:1000 arányban hígítottuk desztillált vízzel, majd azonnal mértük a relatív fluoreszcenciát spektrofotométeren (Jobin Yvon Horiba FluoroMax-3, Franciaország). A gerjesztési és a kisugárzott hullámhossz 488, valamint 525 nm volt.

4.10. Spektrofotometriás enzimaktivitás mérések

Az antioxidáns enzimmérésekhez 0–4°C közötti hőmérsékleten sejtmentes levélkivonatokat készítettünk. A vizsgált növények leveleiből 0,5 g tömegű mintákat vettünk, előhűtött dörzsmozsárba helyeztük és mozsártörővel homogenáltuk mintánként 3 ml hideg, 50 mM-os TRIS–HCl pufferben (pH 7,8), amely 7,5% (w/v) vízzoldékony polivinil-pirrolidon K25-öt és 1 mM EDTA-Na₂-t tartalmazott. A feltárt növényi szövetet lecentrifugáltuk (12.000 g, 20 perc, 4°C), és a felülúszóval dolgoztunk tovább az aktivitások meghatározása során. Az enzimkivonatot a mérés teljes időtartama alatt jeges vízfürdőben tároltuk. A méréseket 25°C-on végeztük Shimadzu UV-160A típusú spektrofotométerrel (Japán).

4.10.1. SOD

A szuperoxid-dizmutáz enzim aktivitását spektrofotometriásan határoztuk meg Paoletti és Mocali (1990) módszerének módosításával. A kontroll reakció minden esetben 800 µl trietanolamin–dietanolamin puffert (100-100 mM, cc. HCl-dal beállított pH 7,4), 4 µl NADH-t (7,5 mM), 25 µl EDTA-MnCl₂-oldatot (100 mM EDTA és 50 mM MnCl₂) és 100 µl növényi kivonatot tartalmazott. Az abszorbanciát 340 nm-en 5 percig mértük, majd 100 µl-nyi 10 mM-os

merkaptotanol-oldatot adtunk a küvettákba. Az abszorbancia csökkenését további 20 percen keresztül mértük. Kalibrációs görbét SOD-oldattal (Sigma-Aldrich) állítottunk elő.

4.10.2. POX

A gvajakol-függő peroxidázok aktivitását gvajakol szubsztráttal Rathmell és Sequeira (1974) módszere alapján határoztuk meg. A reakcióelegy 2,2 ml nátrium-foszfát puffert (100 mM, pH 6,0), 100 µl 50 mM-os gvajakolt (62 mg gvajakol feloldva 10 ml desztillált vízben, 2 mM végkoncentráció), 100 µl 12 mM-os H₂O₂-oldatot és 10 µl növényi kivonatot tartalmazott. A gvajakolból keletkező tetrakonjugátum (kioltási együttható $\epsilon_{436}=26,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) képződését 436 nm hullámhosszágon (üveg vagy műanyag küvettában) követtük nyomon. A kontroll elegy növényi kivonatot nem tartalmazott.

4.10.3. CAT

A kataláz enzim aktivitását Aebi (1984) módszere szerint mértük. A reakcióelegy 2,15 ml végtérfogóban 2 ml nátrium-foszfát puffert (100 mM, pH 6,5), 100 µl H₂O₂-oldatot (269 mM-os, a végkoncentráció 12,5 mM) és 50 µl nyers növényi kivonatot tartalmazott. A hidrogén-peroxid ($\epsilon_{240}=0,040 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) fogyását 240 nm hullámhosszon, kvarc küvettában mértük.

4.10.4. APX

Az aszkorbinsav-peroxidáz aktivitását 2,25 ml végtérfogatú reakcióelegyben határoztuk meg Nakano és Asada (1981) módszere alapján. Az elegy 2 ml TRIS–HCl puffert (50 mM, pH 7,8), 100 µl aszkorbinsav-oldatot (10 mg feloldva 10 ml desztillált vízben, 0,25 mM végkoncentráció), 100 µl 11,25 mM-os H₂O₂ (0,5 mM végkoncentráció) és 50 µl nyers növényi enzimkivonatot tartalmazott. Az aszkorbinsav oxidálódásából eredő abszorpcióváltozást 290 nm-en (kvarc küvettában), 3 percig mértük. A kontroll meghatározására szolgáló elegy TRIS–HCl puffert tartalmazott H₂O₂ helyett. Az aszkorbinsav moláris kioltási együtthatója 290 nm-en $2,8 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

4.10.5. DHAR

A dehidroaszkorbát-reduktáz enzim aktivitásának meghatározásához a dehidroaszkorbinsav (DHA) redukcióját követtük figyelemmel 265 nm hullámhosszon (aszkorbát $\epsilon_{265}=14 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) kvarc küvettában (Klapheck *et al.* 1990). A reakcióelegy 2 ml Na-foszfát puffert (50 mM, kiegészítve 1 mM EDTA-Na₂-val, pH 6,5), 100 µl redukált glutationt (7 mg GSH feloldva 1 ml pufferben, 1 mM végkoncentráció), 100 µl dehidroaszkorbátot (2 mg DHA feloldva 1 ml pufferben, 0,5 mM végkoncentráció) és 100 µl növényi kivonatot tartalmazott. A kontroll reakcióhoz puffert tettünk enzimkivonat helyett.

4.10.6. GR

A glutation-reduktáz enzim aktivitását a NADPH oxidációjának 340 nm hullámhosszon történő megfigyelésével mértük ($\epsilon_{340}=6,2 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) Klapheck és munkatársai (1990) módszerével. A reakcióelegy 2 ml TRIS–HCl puffert (50 mM, pH 7,8), 100 μl NADPH-t (2 mg-ot oldottunk föl 1 ml pufferben, 0,1 mM végkoncentráció), 300 μl oxidált glutationt (3 mg GSSG-t oldottunk 1 ml pufferben a kívánt 5,8 mM-os töménységhez) és 100 μl felülúszót tartalmazott. Minden minta saját kontroll reakciójához puffert adtunk a 300 μl GSSG-oldat helyett.

4.10.7. GST

A glutation-S-transzferáz enzim aktivitását Mauch és Dudler leírása (1993) szerint mértük. A reakcióelegy 2,75 ml végtérfogatban 2 ml pufferből (100 mM Na-foszfát, 0,1 mM EDTA- Na_2 , pH 6,5), 500 μl 20 mM-os, a fenti pufferben feloldott redukált glutationból (GSH) (60,8 mg 10 ml pufferben, 3,6 mM végkoncentráció), 150 μl 18,3 mM-os, etanolban oldott 1-klór-2,4-dinitro-benzolból (37 mg 10 ml 100%-os etanolban, 1 mM végkoncentráció) és 100 μl növényi kivonatból állt. Az 1-klór-2,4-dinitro-benzolból képződött konjugátum ($\epsilon_{340}=9,6 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$) mennyiségének változását mértük 340 nm hullámhosszon. A kontroll elegy növényi kivonatot nem tartalmazott.

4.11. Nem-enzimatis antioxiidánsok meghatározása

A fenti enzimeken kívül alacsonyabb mólsúlyú antioxiidánsok is, főként az aszkorbát és a redukált glutation (GSH), jelentős szerepet játszanak az antioxiidatív védekezésben. Nyers teljes levél kivonatokban mértük mind az aszkorbinsav, mind a glutation redukált és oxidált formájának mennyiségét. Méréseink az árpa-lisztharmat kapcsolat későbbi fázisaira, a fertőzés utáni negyedik és hetedik napra irányultak. A növényi anyagot (0,5 g levél) 2,5 ml 5%-os (w/v) metafoszforsavban homogenáltuk $0-4^\circ\text{C}$ hőmérsékleten. Centrifugálás után (12.000 g, 30 perc, 4°C) a felülúszót használtuk az antioxiidánsok mennyiségének meghatározására.

4.11.1. Aszkorbinsav-tartalom fotometriás mérése

Az aszkorbinsav koncentrációját Foyer és munkatársai (1983) nyomán fotometriásan mértük aszkorbát-oxidáz enzim segítségével. A redukált aszkorbát mennyiségének meghatározására 125 μl metafoszforsavas kivonatot semlegesítettünk 25 μl 1,5 M-os trietanolaminnal. Alapos keverést követően 150 μl Na-foszfát puffert (150 mM, pH 7,4) és 75 μl vizet adtunk a mintákhoz és ismét elkevertük őket. A reakcióelegy 2 ml Na-foszfát pufferből (100 mM, pH 5,6) és 200 μl , a fenti módon elkészített oldatból állt kvarc küvetében. Az oldat kioltását azonnal mértük 265 nm hullámhosszon, majd 1 egységnyi aszkorbát oxidáz (Cucurbita enzim, Sigma-Aldrich) hozzáadása után az abszorbancia-csökkenést követtük figyelemmel.

A dehidroaskorbát mennyiségének meghatározására nem-enzimatis úton redukáltuk azt aszkorbáttá ditiotreitolt segítségével, majd az összes aszkorbinsav-tartalmat mértük a mintákban. A levelekből készített kivonatokat (125 µl) a fent leírt módon semlegesítettük, elkevertük 150 µl Na-foszfát pufferrel és 75 µl 10 mM-os ditiotreitollal, majd 15 percig szobahőmérsékleten inkubáltuk a DHA redukálódása alatt. Ezt követően a fent leírt módon mértük a teljes aszkorbát-tartalmat. Az oldat extinkcióját az elegyítés után azonnal megmértük 265 nm-en, majd 1 U aszkorbát-oxidáz enzimet adtunk az oldathoz, és az extinkció csökkenését addig követtük, amíg a minimumot el nem érte. A két adat különbsége arányos az oldat aszkorbinsav-tartalmával. A DHA-koncentrációt ezek után úgy számoltuk ki, hogy az AA-tartalmat kivontuk az összes aszkorbát-tartalomból. Kalibrációs görbe felállítására 5 %-os metafoszforsavban oldott AA- és DHA-oldatokat készítettünk.

4.11.2. Glutation-tartalom fotometriás mérése

Az oxidált és redukált glutation mennyiségét spektrofotométerrel határoztuk meg, Law és munkatársai (1983) módszerén alapuló visszaforgatásos enzimatis mérésel, a GR enzim segítségével. A metafoszforsavas növényi kivonatokból 100 µl-nyi mennyiséget közömbösítettünk 36 µl 1 M-os trietanolaminnal. A GR enzim és a NADPH hozzáadása után a 412 nm-nél bekövetkező abszorbancia-növekedés utalt az összes glutation mennyiségére. A reakcióelegy K-foszfát pufferben (50 mM, pH 7,5), 2,5 mM EDTA-t, 1 mM 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoésavat), 1 U GR enzimet (from Baker's yeast, Type III, Sigma-Aldrich), 0,2 mM NADPH-t és 20 µl semlegesített növényi kivonatot tartalmazott 1 ml-es térfogatban. Az oxidált glutation (GSSG) meghatározására a mintában lévő redukált glutationt (GSH) derivatizáltuk a kivonatokhoz adott 8 µl 2-vinilpiridinnel, 25°C-on inkubálva a mintákat 1 órán keresztül. A GSSG-tartalmat is a fent leírt módon mértük, itt 50 µl semlegesített kivonatot adva az 1 ml-es reakcióelegyhez. A kalibrációs görbéket 5%-os metafoszforsavban feloldott GSH- és GSSG-oldatokkal készítettük.

4.12. Génkifejeződési vizsgálatok

A hőkezelésen (lásd: 4.2.4. fejezet) és/vagy lisztharmat-fertőzésen (lásd: 4.4.2. fejezet) átesett árpa elsődleges leveleit (mintánként legalább 10 levelet) gyűjtöttük be folyékony nitrogénben azonnal lefagyasztva azokat a génexpressziós méréseinkhez. A hősokk-kezelés időpontjában vettük a nulla órás kontroll mintát, majd 24 óra elteltével vettünk hőkezelt, illetve nem kezelt kontroll mintát, ezzel egy időben fertőzve a növények egy részét mindkét csoportban. a fejezetben leírt módon. További 2 időpontban (4 óra, illetve 24 óra elteltével) a fertőzés után vettünk még mintákat minden kezelésből.

A teljes növényi RNS-t guanidin-tiocianátos lízist követő szilika-membrán oszlopos módszerrel (Viogene Plant Total RNA Extraction Miniprep System, Tajvan) vontuk ki a levelekből

(mintánként kb. 200 mg levélanyagból), a készlethez mellékelt utasításokat követve. A kivont RNS mennyiségét és tisztaságát spektrofotométeren ellenőriztük. Az RNS (és DNS) elnyelési maximuma 260 nm hullámhossznál van, a fehérjéké pedig kb. 280 nm-nél. Az RNS mennyiségét a mintákban az A_{260} értékkel határoztuk meg: $c=A_{260} \times \text{hígítás}/25$ (moláris kioltási együttható). Az A_{280} érték pedig a fehérjével való szennyezettségre utalt. Az A_{260}/A_{280} arányt 1,6 és 2,0 szélsőértékek között fogadtuk el megfelelőnek. Ezt követően megfuttattuk 1%-os formaldehid-agaróz gélen a mintákat, és az elektroforézis után etídium-bromidos festéssel UV-fényben ellenőriztük a kivont RNS koncentrációját és épségét.

Az alacsony példányszámban előforduló transzkriptumok kimutatásához félkvantitatív módszert alkalmaztunk: reverz transzkripció lépéssel egybekötött nukleinsav-sokszorozítást végeztünk polimeráz enzimmel láncreakcióban (RT-PCR: *reverse transcription polymerase chain reaction*), az enzimkeveréket gyártó cég utasításait követve (Qiagen OneStep RT-PCR Kit, Hilden, Németország). A cDNS sokszorozását még a folyamat exponenciális fázisában állítottuk le, tehát minden vizsgált génnél olyan, külön-külön beállított ciklusszámmal dolgoztunk, ahol még megmaradtak a különbségek a különböző átíróadási szintek között. A PCR reakciókhoz az alábbi génekre specifikus indítószekvencia-párokat (primereket) adtuk (gén neve, indítószekvencia-pár tervezője/leírója, alkalmazott ciklusszám, alkalmazott primer kapcsolódási hőmérséklet (*annealing temperature*, T_a), előre- és visszainduló primer nukleinsav-sorrendje):

HvHsp70 (Waller *et al.* 2008): 28 ciklus, $T_a=57^\circ\text{C}$,

5'-CCAAGAAGTCGCAGGTTTTC-3' és 5'-GGAATGCCAGAAAGGTCAAA-3'

BAX inhibitor 1(BI-1) (Hückelhoven *et al.* 2003): 28 ciklus, $T_a=57^\circ\text{C}$,

5'-ATGGACGCCTTCTACTCGACCTCG-3' és 5'-GCCAGAGCAGGATCGACGCC-3'

HvWRKY1 (Eckey *et al.* 2004): 26 ciklus, $T_a=56^\circ\text{C}$,

5'-GACGAGGGACCCCAGCTTCAA-3' és 5'-CATGGGAATTATGGAACGGAACATTTG-3'

HvWRKY2 (Leib 2005): 31 ciklus, $T_a=56^\circ\text{C}$,

5'-GGTTCGCTTCATTCTTGACG-3' és 5'-AACGACTGGTGGTGGTTGTT-3'

Az „egymenetes” RT-PCR-reakció cDNS-írási szakasszal kezdődött (50°C 30 percig, 95°C 15 percig), majd a fenti ciklusszámok szerint ismétlődő DNS-sokszorozítás következett (94°C 30 mp-ig, T_a 30 mp-ig, 72°C 40 mp-ig), végül egy záró elongációs lépéssel végződött (72°C 5 percig). Az alkalmazott ciklusszámok mellett lehetővé vált ibolyántúli (UV) fényben láthatóvá tenni a megsokszorozott cDNS-szakaszt gélelektroforézissel (1%-os TAE agarózgélen) történő szétválasztás után, etídium-bromidos festéssel.

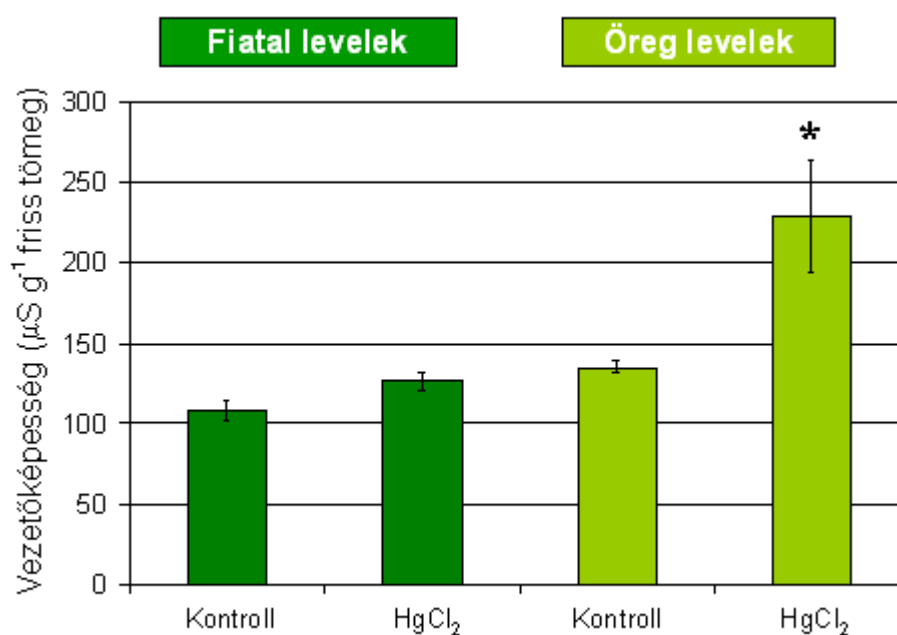
4.13. Statisztika

Legkevesebb három független (biológiai) kísérletet végeztünk minden esetben, és egy kísérlet során legalább 3 párhuzamos mintavétel történt, majd kezelésként lehetőség szerint legalább 2 mérési (technikai) ismételésre került sor. Az adatokat Student-féle t-próbával hasonlítottuk össze. Az eltéréseket $P=0,05$ szinten minősítettük szignifikánsnak. Az ábrákon és táblázatokban feltüntetett értékek az átlagot \pm szórást (S.D.) jelölik.

5. EREDMÉNYEK

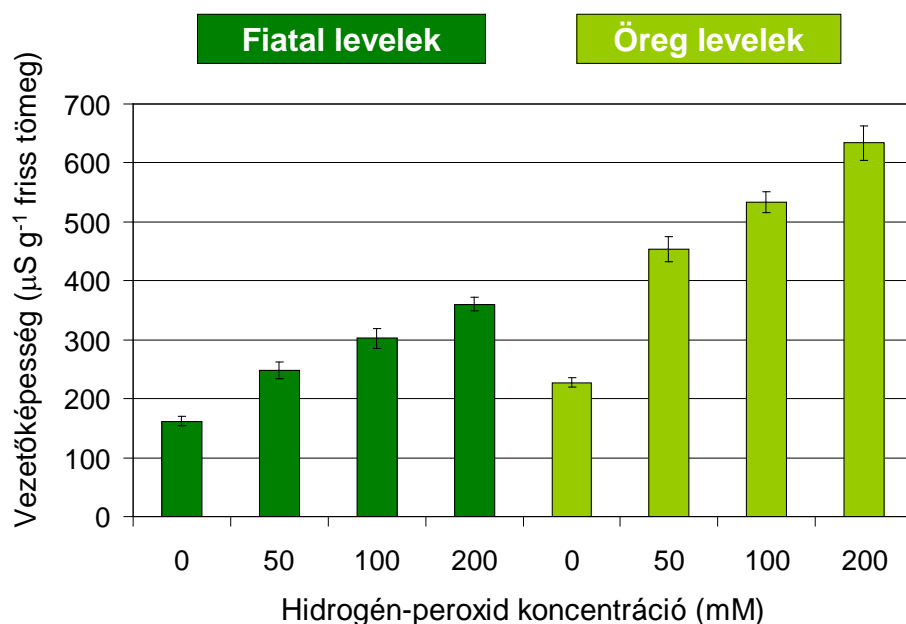
5.1. A juvenilitás befolyása dohány oxidatív stressztűrő-képességére

A higany-klorid kezeléssel kiváltott nehézfémstressz hatására bekövetkező sejtmembrán károsodás következtében fokozott ion-kiáramlást tapasztaltunk, ami a vízzel álkezelt kontrollhoz képest az öregebb, szenescens levelek esetében többszöröse volt a fiatal leveleknél észleltékhez képest (6. ábra).



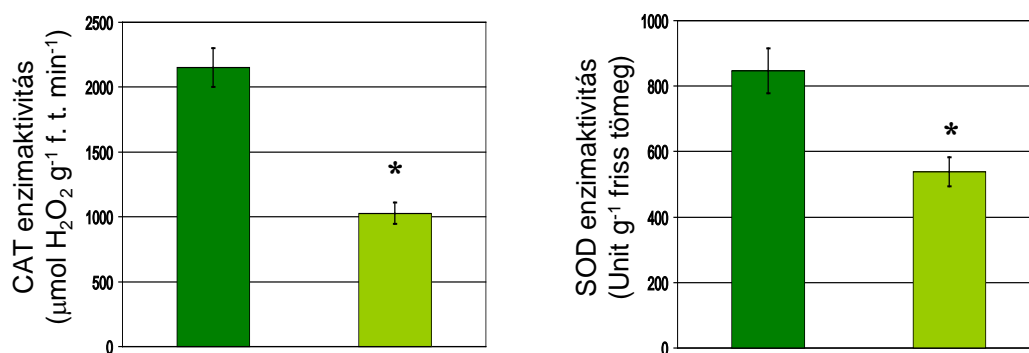
6. ábra. Vezetőképesség növekedésével mért elektrolit-kiáramlás fiatal (sötétzöld) és öreg (világoszöld) ‘Samsun’ dohánylevél-korongokból 0,01%-os higany-klorid kezelést követően. A mérést 24 óra úsztatás után végeztük kezelt (HgCl_2) és kontroll, vízzel álkezelt (Kontroll) dohánylevelekből vett mintákon.

Hasonlóképpen megfigyeltük, hogy a hidrogén-peroxid (külsőleg adagolt ROF, azaz közvetlen oxidatív stressz) hatására bekövetkező membránkárosodást jelző elektrolit-kiáramlás gyengébb volt a fiatal levélkorongokból, mint az öregekből. A különbség már 1 óra után is szignifikáns volt, de 48 óra H_2O_2 -on való úsztatás után különösen markánsan megmutatkozott (7. ábra). Magasabb H_2O_2 -koncentrációknál arányosan jelentősebb mértékű kiáramlást figyeltünk meg mind a fiatal, mind az öreg levelekből vágott korongok esetében.



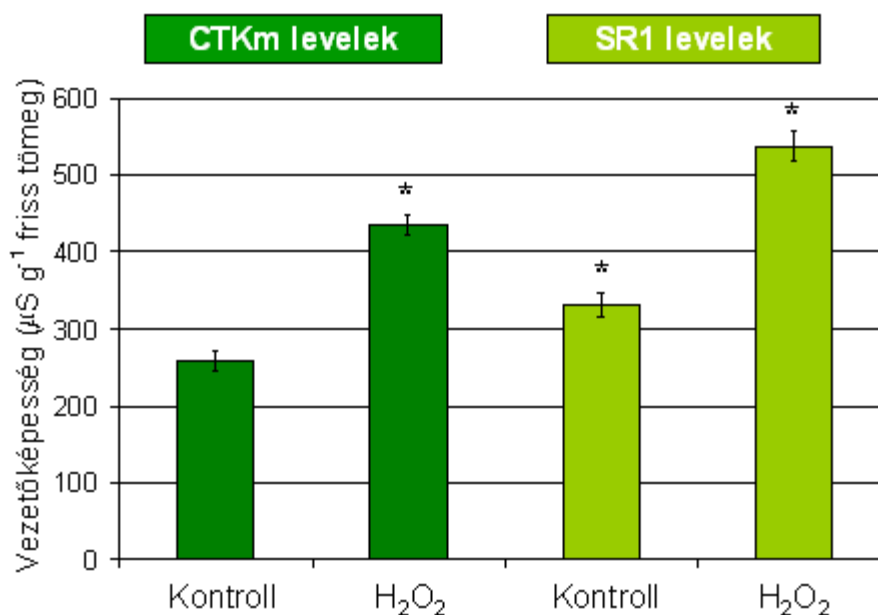
7. ábra. Elektrolit-kiáramlás különböző töménységű hidrogén-peroxid oldatokon 48 órán keresztül úsztatott fiatal (sötétzöld) és öreg (világoszöld) ‘Samsun’ dohánylevél-korongokból.

A magasabb fokú stressztűrő-képességgel összhangban a szuperoxidot hidrogén-peroxiddá és oxigénné alakító SOD enzim aktivitása 50%-kal nagyobb volt fiatal levelekben, mint az öregekben, a H_2O_2 -ot bontó kataláz enzim aktivitása pedig kétszer magasabb volt a fiatal levelekben (8. ábra).



8. ábra. Antioxidáns enzimek (CAT: kataláz és SOD: szuperoxid-dizmutáz) aktivitása fiatal (sötétzöld) és öreg (világoszöld) ‘Samsun’ dohánylevelekben.

Az előző eredményeket megerősítve az öregedésében gátolt, citokinin-túltermelő CTKm dohánylevelek membránjait kevésbé károsította a hidrogén-peroxid kezelés, mint a kontroll, nem transzgenikus SR1 dohányt (9. ábra).



9. ábra. Elektrolit-kiáramlás citokinin-túltermelő (CTKm) dohány levélkorongokból (sötétzöld) és a kontroll, nem transzgenikus fajta (SR1) levélkorongjaiból (világoszöld) 24 óra úsztatás után 100 mM hidrogén-peroxid oldaton (HP) illetve desztillált vízen (Kontroll).

5.2. A szalicilsav szerepe a SzSzR-ban

5.2.1. Dohány mozaik vírus tünetek

Az alsó levelek dohány mozaik vírussal való fertőzése után 2 héttel Xanthi-nc és transzgenikus NahG dohányok felső leveleit fertőztük ugyanezen kórokozóval. A fertőzést követő 40-48 órával már megfigyelhetőek voltak a felső leveleken a vírus-indukálta elhalt foltok, amiknek vizuális kiértékelését a 3. táblázatban foglaltuk össze.

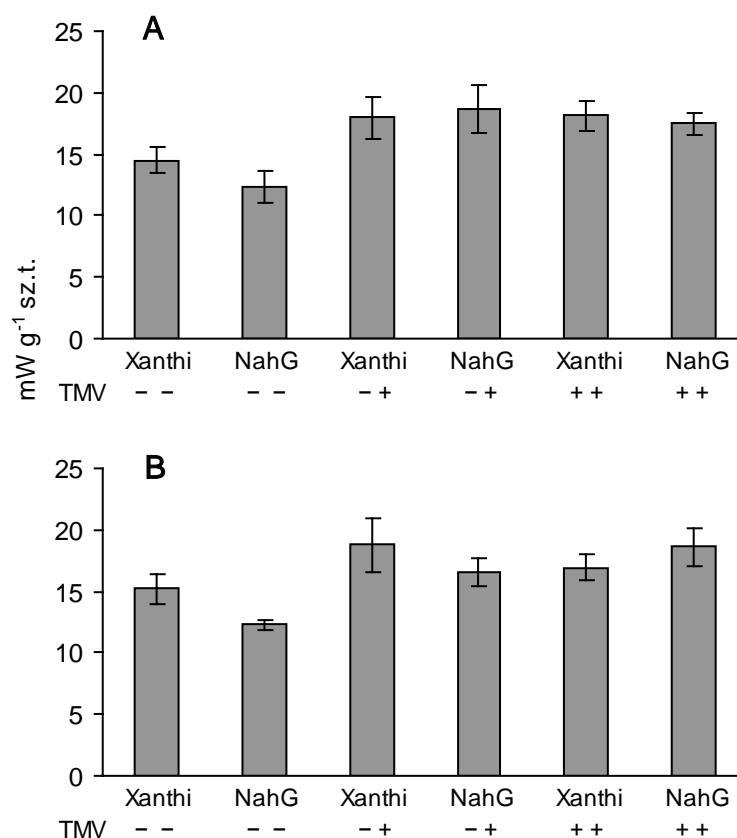
3. táblázat. Dohány mozaik vírus (TMV)-fertőzés után 48 órával kialakuló nekrotikus tünetek 10 hetes dohánynövények felső levelein. A fertőzési elrendezést a 2. táblázat tartalmazza a 4.4.1. bekezdésben. Az átlagos léziósűrűség alapján határoztuk meg az elhalt levélfelület méretét.

	Léziók mérete (mm)		Léziók száma (cm ⁻²)		Elhalás (levélfelület %)	
	Xanthi-nc	NahG	Xanthi-nc	NahG	Xanthi	NahG
TMV – +	1,08 ± 0,31	1,54 ± 0,41	2,98 ± 1,55	2,50 ± 1,38	2,95	4,95
TMV + +	0,66 ± 0,18	1,58 ± 0,47	3,07 ± 1,63	2,57 ± 1,25	1,11	5,47

Mivel az alsó levelek TMV-fertőzése SzSzR-t indukált egy következő fertőzés ellen a távolabbi levelekben, szignifikánsan ($P < 0,5$) kisebb méretű nekrotikus léziók alakultak ki a Xanthi dohányok felső levelein. Ennek eredményeképpen a teljes elhalt levélfelület 70%-kal csökkent a SzSzR-rel rendelkező Xanthi növényekben a nem előfertőzöttekhez képest. Az NahG dohányok sokkal kevésbé voltak ellenállóak a TMV-fertőzéssel szemben, nagyobb elhalt foltok alakultak ki rajtuk, így a Xanthi dohányokhoz képest a levélfelületük 70%-kal nagyobb része nekrotizálódott. Mivel a NahG dohányok nem képesek SzSzR-válaszra, az alsó levelek TMV-fertőzése nem befolyásolta a felső levelek későbbi fertőzésének kimenetelét. A léziósűrűséget nem befolyásolta sem a *nahG* gén kifejeződése, sem a Xanthi növények SzSzR-válasza.

5.2.2. A levelek hőtermelése

Az exotherm hőleadás tekintetében szignifikáns különbséget mértünk a fertőzetlen Xanthi növények javára a szintén fertőzetlen NahG dohányokhoz képest (10. ábra).



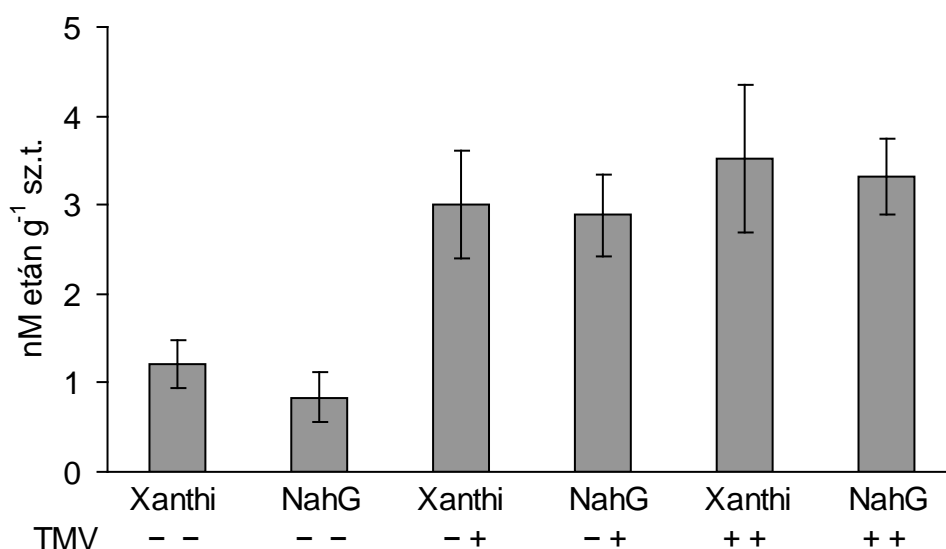
10. ábra. Metabolikus hőtermelés 10 hetes Xanthi-nc (Xanthi) és NahG dohánynövények TMV-vel fertőzött felső leveleiben a fertőzést követően 48 órával (A) és 72 órával (B).

Nem tapasztaltunk változást a hő kibocsátásban 24 órával a TMV-fertőzés után egyik vonalban sem (ábra nélkül). A fertőzést követően 48 órával viszont, mikorra már kialakultak a TMV-indukálta

nekrotikus tünetek, látványosan megnövekedett a fertőzés hatására a hőtermelés (10.A. ábra). Annak ellenére, hogy a fertőzött növényekben nagy különbségeket tapasztaltunk a látható levélkárosodás mértékében a kezelések között, a hőkibocsátási ráta nem mutatott jelentős változást sem a dohányvonalak milyenségével, sem az SzSzR-t indukáló előzetes fertőzéssel összefüggésben. További 24 órával később, azaz a fertőzés után 3 nappal a hőkibocsátási eredmények hasonlóak voltak a két nap után mértékhez (10.B. ábra).

5.2.3 Lipid-peroxidáció

A membránlipidek a TMV-fertőzés hatására peroxidáción mentek keresztül, amit a linolénsav 16-hidroperoxidjának bomlásából keletkező, hőkezeléssel fejlesztett etán jelzett. Az etán-kibocsátás mértéke a különböző kezeléseken átesett dohánylevelekből összezsengett a kalorimetriával kapott adatokkal. A hőkezelés útján felszabadított etán mennyisége 30%-kal kevesebb volt fertőzetlen NahG dohánylevelekben, mint Xanthi esetében (11. ábra). A TMV-fertőzés hatására mindkét dohányvonalban erőteljesen megemelkedett az etántermelés. A vírusfertőzés tüneteinek súlyossága 48 óra után azonban nem mutatott összefüggést az etán-kibocsátással (11. ábra). A lipid-peroxidáció mértéke hasonló volt mind a NahG, mind a SzSzR-t mutató, s nélküli Xanthi dohányok levelében.



11. ábra. Hőkezeléssel termelt etán-kibocsátás 10 hetes Xanthi-nc (Xanthi) és NahG dohány-növények TMV-vel fertőzött felső leveleiből a fertőzést követően 48 órával.

5.2.4. Lipid-összetétel

A kísérletben részt vevő dohányok leveleiből kivont foszfolipid-frakció zsírsav-összetételét a 4. táblázatban tüntettük föl. A Xanthi dohányban a linolénsav tette ki a teljes zsírsavmennyiség

57%-át. Ez az arány jelentősen alacsonyabb volt a transzgenikus NahG dohánylevelekben, s mivel a linolsav mennyisége viszont itt nagyobbnak bizonyult, a linolénsav/linolsav mutató kisebb volt, mint a nem transzgenikus Xanthi dohánylevelekben. A TMV-fertőzés nem okozott jelentős változást egyik dohányvonalban sem.

4. táblázat. Zsírsav-összetétel (mólszázalékban) 10 hetes Xanthi-nc (Xanthi) és NahG dohány-növények TMV-vel fertőzött (TMV) és kontroll (K) felső leveleiből a fertőzés után 3 nappal izolált foszfolipid-frakcióban. 18:3/18:2 (linolénsav/linolsav arány), U/S (telítetlen/telített zsírsav arány), DBI (*double bond index*, kettős kötés mutató) = $\sum (\text{mol \% zsírsav} \times \text{kettős kötések száma})/100$.

Zsírsav	Xanthi K	Xanthi TMV	NahG K	NahG TMV
16:0	16,10 ± 1,10	16,30 ± 1,00	17,00 ± 1,10	16,00 ± 0,90
16:1	2,70 ± 0,30	2,60 ± 0,20	3,70 ± 0,40	2,90 ± 0,40
18:0	3,90 ± 0,20	4,30 ± 0,30	4,50 ± 0,30	4,70 ± 0,50
18:1	1,30 ± 0,20	1,50 ± 0,20	1,80 ± 0,20	1,50 ± 0,30
18:2	18,80 ± 1,10	19,00 ± 1,20	20,20 ± 1,60	21,20 ± 1,30
18:3	57,20 ± 2,20	56,30 ± 1,90	52,80 ± 2,00	53,70 ± 2,00
18:3/18:2	3,12 ± 0,19	2,94 ± 0,09	2,63 ± 0,29	2,52 ± 0,12
U/S	3,95 ± 0,21	3,85 ± 0,28	3,66 ± 0,26	3,77 ± 0,25
DBI	2,14 ± 0,10	2,12 ± 0,07	2,04 ± 0,04	2,05 ± 0,05

A szterolok közül a szitoszterol fordult elő legnagyobb mennyiségben a dohánylevelekben, amit szorosan követett a sztigmaszterol, kampeszterol és koleszterol. A szalicilsavat nélkülöző NahG növények valamennyivel több kampeszterolt tartalmaztak, mint a Xanthi dohány (5. táblázat). A vírusfertőzés a Xanthi növényekben nem befolyásolta a szterol-összetételt, a NahG dohányban viszont TMV-fertőzés hatására 37%-kal növekedett a sztigmaszterol/szitoszterol arány.

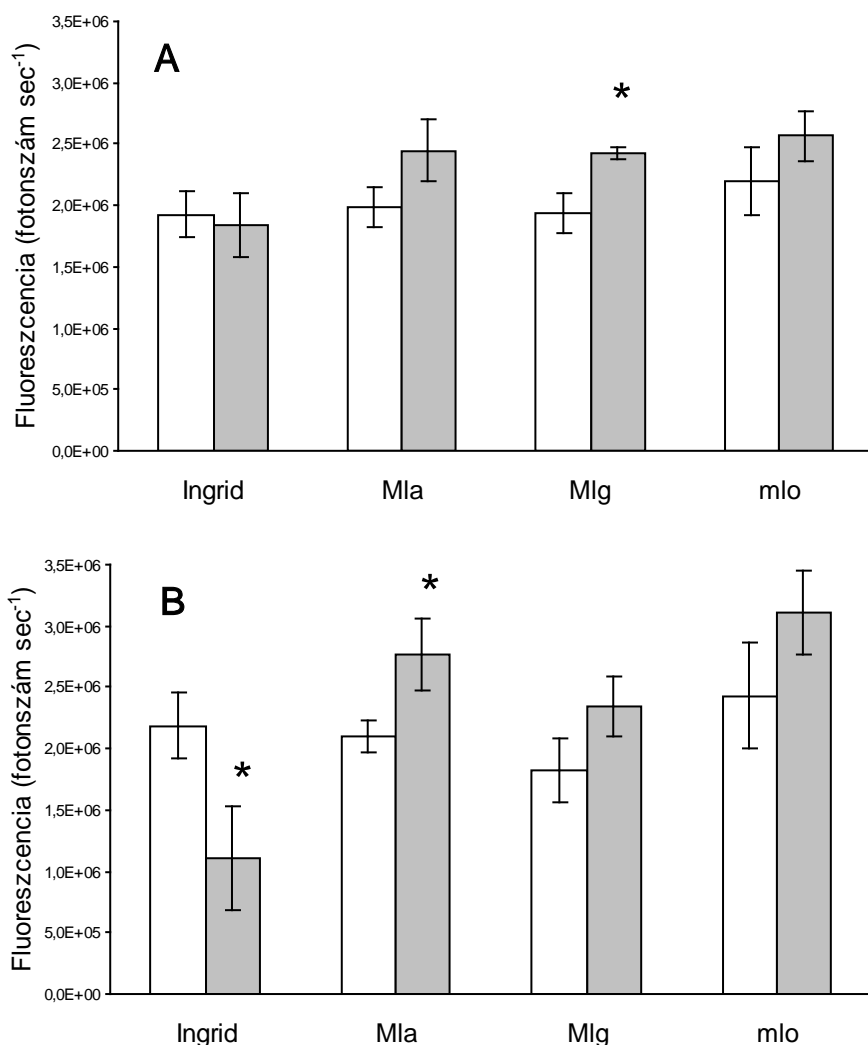
5. táblázat. Szterol-összetétel (mólszázalékban) 10 hetes Xanthi-nc (Xanthi) és NahG dohány-növények TMV-vel fertőzött (TMV) és kontroll (K) felső leveleiből 3 nappal a fertőzés után.

Szterol	Xanthi K	Xanthi TMV	NahG K	NahG TMV
Koleszterol	4,70 ± 0,75	5,03 ± 0,59	4,15 ± 0,37	4,02 ± 0,78
Kampeszterol	18,46 ± 0,35	17,30 ± 0,44	20,78 ± 0,49	19,59 ± 0,70
Sztigmaszterol	23,86 ± 0,35	24,69 ± 2,37	22,21 ± 1,11	27,93 ± 1,04
β-Szitoszterol	52,98 ± 0,56	52,98 ± 2,76	52,86 ± 1,91	48,46 ± 0,94

5.3. Antioxidáns és egyéb biokémiai változások különböző árpa–lisztharmat kapcsolatokban

5.3.1. Hidrogén-peroxid tartalom

A lisztharmat-fertőzést követő negyedik és hetedik napon vizsgáltuk a hidrogén-peroxid tartalmat fogékony (Ingrid) és rezisztens (Mla, Mlg, mlo) árpalevelekben, a fertőzés hosszú távú hatásainak tisztázása végett. A fertőzés után négy nappal mind a három rezisztens árpavonalban 20-25%-kal megemelkedett a hidrogén-peroxid mennyisége a fertőzetlen kontrollhoz képest, a fogékony árpaiban viszont nem figyeltünk meg jelentős változást (12.A. ábra). A hetedik napon azonban a fogékony kapcsolatban a hidrogén-peroxid tartalom drámai esést mutatott (a fertőzetlen kontrollban mérhetőnek felére csökkent), míg a rezisztens Mla, Mlg, mlo vonalakban továbbra is nagyobb mennyiségben volt kimutatható fertőzés után, mint a fertőzetlen levelekben (12.B. ábra).



12. ábra. Hidrogén-peroxid tartalom lisztharmattal fertőzött (sötét oszlopok) és fertőzetlen kontroll (világos oszlopok) árpalevelekben fertőzés után 4 nappal (A) és 7 nappal (B), fogékony (Ingrid) és rezisztens (Mla, Mlg, mlo) árpavonalakban.

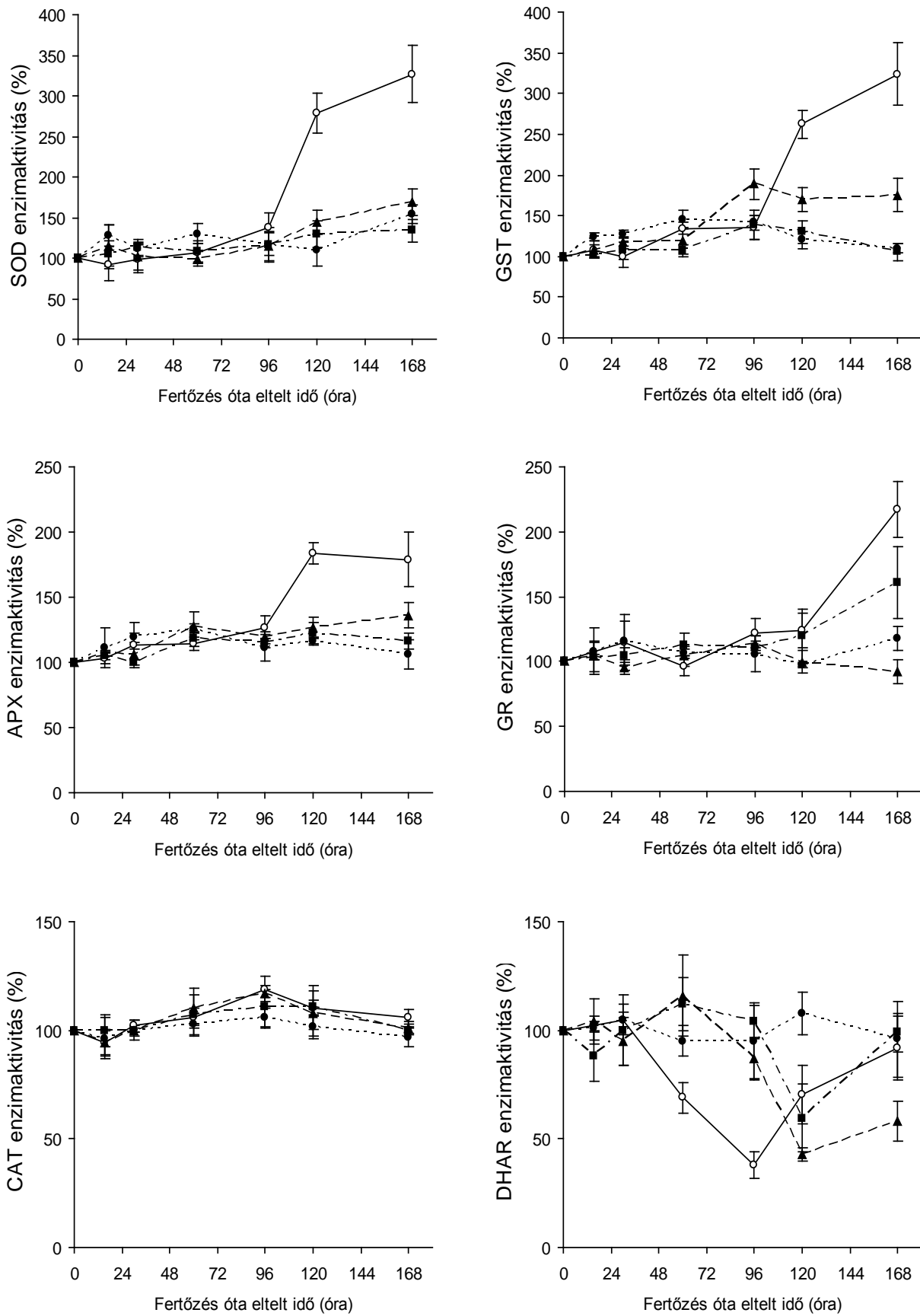
5.3.2. Antioxidáns enzimaktivitások

Lisztharmat-fertőzést követően vizsgáltuk az antioxidáns enzimek aktivitásának változását a fertőzetlen kontrollkhoz képest a fogékony 'Ingrid' árpában, valamint a rezisztens, közel-izogén Mla, Mlg és mlo vonalakban. A fertőzés után különböző időpontokban vizsgáltuk az árpaleveleket. A kapcsolat „korai” fázisában bekövetkező változásokat követtük nyomon a fertőzés utáni 15. órában (mielőtt a gomba az epidermisz sejtekbe behatolna), 30. órában (közvetlenül a behatolási kísérlet illetve behatolás után) és 60. órában (miután a betegség vagy a HR kialakul) vett mintákkal. A gomba-növény kapcsolat „kései” fázisát a fertőzés után 4 nappal (a gomba sporulációja előtt), 5 nappal és 7 nappal (a gomba sporulációja után) vett mintákkal jellemeztük (13. és 14. ábra).

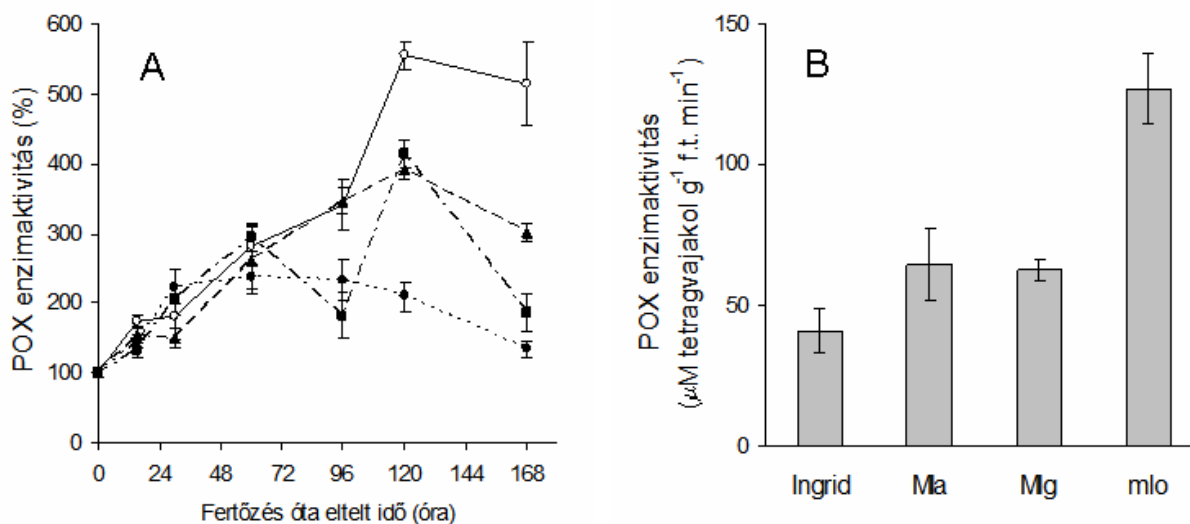
A fogékony kapcsolatban megemelkedett a POX, SOD, GST, APX és GR enzimek aktivitása a késői időpontokban, azaz 5 és 7 nappal a fertőzés után: mégpedig a fertőzetlen kontroll növények leveleiben mért enzimaktivitásokhoz képest a POX aktivitása ötszörösére, a SOD és a GST aktivitása háromszorosára, az APX és a GR aktivitása pedig kétszeresére növekedett a fogékony Ingrid árpa levelében. A vizsgált enzimek többsége csak késői időpontban reagált a fertőzésre, kivéve a POX enzimet, aminek az aktivitása már 15 órával a fertőzés után indukálódott. A DHAR aktivitása átmeneti, fokozatos csökkenést mutatott a fertőzés következtében, egészen a negyedik napi mélypontig, majd a hetedik napra szintén fokozatosan visszaállt a fertőzetlen kontrollkban mért értékre. A CAT aktivitásban nem találtunk jelentős változásokat, kivéve egy enyhe, átmeneti aktivitásnövekedést a fogékony árpában, ami a negyedik napon érte el a legmagasabb értéket a fertőzetlen kontrollhoz képest.

Az Mla árpában is a fogékony árpában mérthez hasonló tendenciájú, ám jóval kisebb mértékű változásokat figyeltünk meg az enzimaktivitások alakulásában, a fertőzés kései szakaszában. A POX aktivitás négyszeresére, míg a SOD, GST és APX aktivitás kb. 50%-kal növekedett meg a kontrollhoz viszonyítva 5 és 7 nappal a fertőzés után, míg a DHAR aktivitásban csökkenést észleltünk itt is, csak később bekövetkező mélyponttal, mint a fogékony vonalban.

Ellentétben a fogékony fajtával, a fertőzés következtében legfeljebb csupán kismértékű változás következett be az Mlg és mlo vonalak SOD, GST, APX és GR aktivitásában, kivéve a GR enzimaktivitást, ami 50%-kal megnövekedett a fertőzést követő hetedik napra az Mlg árpa leveleiben. A POX aktivitás viszont jelentősen emelkedést mutatott mind az Mlg vonalban (közel négyszeresére), mint az mlo árpában (kétszeresére) a fertőzés következtében. Az Mla vonalban tapasztaltakhoz hasonlóan az Mlg árpában fertőzés utáni 5. napon érte el a POX a csúcstevékenységet, míg az mlo esetében ez a 3. napon következett be, majd a 7. napra mind a négy vizsgált árpavonalban kezdett visszaesni a kontrollszint irányába a POX aktivitás.



13. ábra. Lisztharmat-fertőzés hatása fogékony (○) és Mla- (▲), Mlg- (■), mlo- (●) rezisztens árpavonalak enzimeinek aktivitására. Minden vonalnál a fertőzött kontroll = 100%.

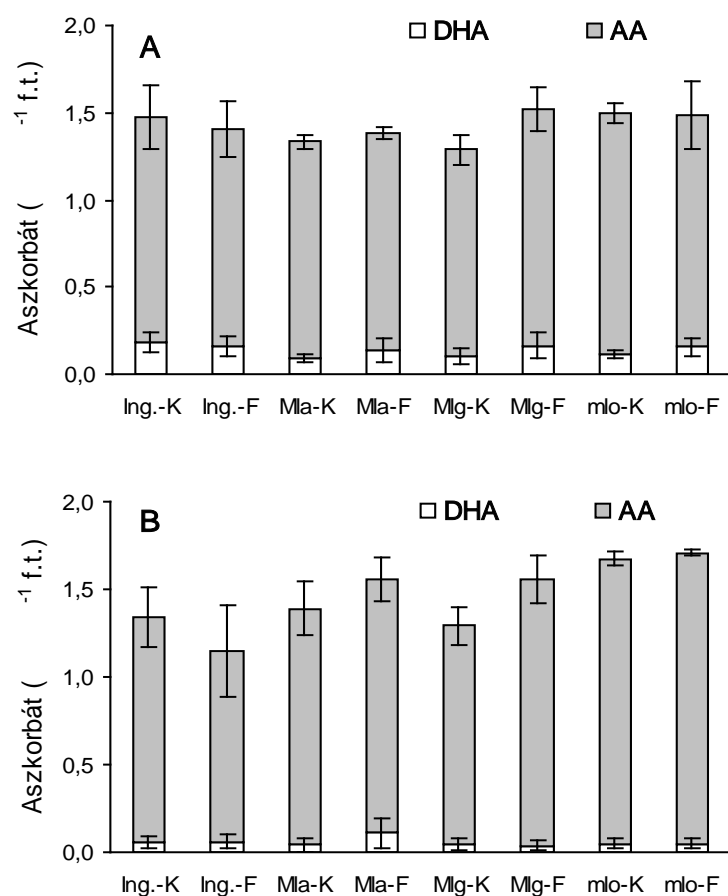


14. ábra. A. Peroxidáz enzimaktivitás alakulása lisztharmat-fertőzés hatására fogékony (○) és Mla- (▲), Mlg- (■), mlo- (●) rezisztens árpavonalakban. Minden vonalnál a fertőzetlen kontroll = 100%.
B. Peroxidáz enzimaktivitás 14 napos fertőzetlen Ingrid, Mla, Mlg és mlo árpalevelekben.

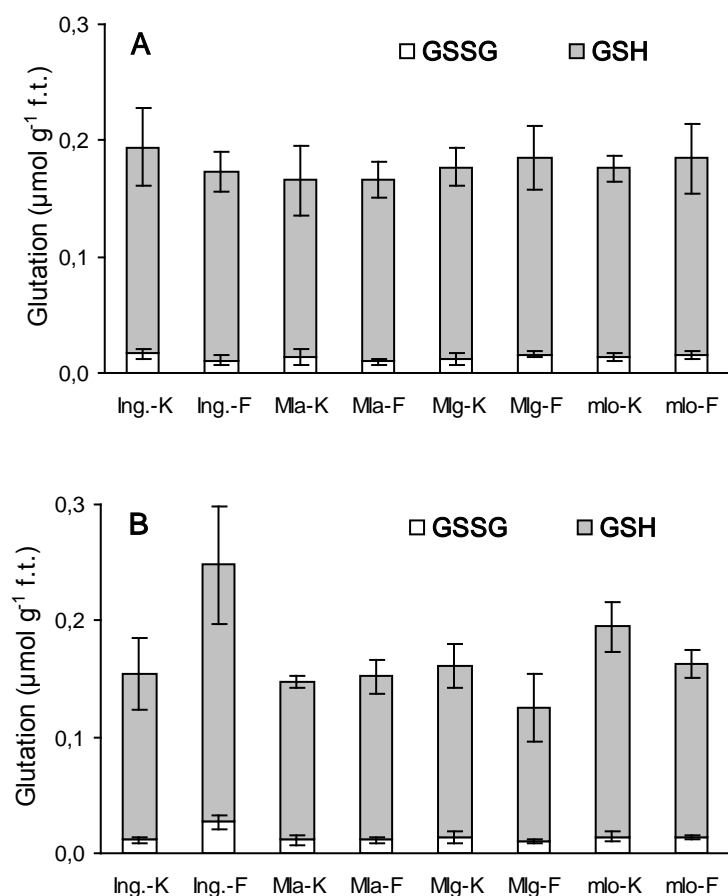
Itt érdemes megjegyezni, hogy a mutáns *mlo* gént hordozó árpában fertőzés nélkül is folyamatosan és szignifikánsan emelkedik a POX aktivitás a napok múlásával, azaz a szenescenciával párhuzamosan, ami a vad típusú, azaz funkcionális *Mlo* génnel rendelkező többi vonalban (fogékony, Mla és Mlg árpa) nem figyelhető meg. Hétnapos növényekben (a kísérleteinkben a 0. nap, azaz a fertőzés időpontja) a POX aktivitás csak kismértékben mutatott eltérést az *mlo* és az *Mlo* gént hordozó árpavonalak között. Hét nappal később viszont már kétszeresére nőtt a POX aktivitás a fertőzetlen *mlo* növények leveleiben a szintén fertőzetlen *Mlo* növényekhez képest (14. ábra). A magasabb POX aktivitás velejárója az öregedési folyamatoknak, s ebben az esetben alátámasztja azt a megfigyelést, miszerint az *Mlo*-fehérjét nem kódoló mutáns növények szenescenciája gyorsabb a vad típusú árpához képest.

5.3.3. Aszkorbát- és glutation-tartalom

Vizsgáltuk az aszkorbát–glutation ciklus nem-enzimatis antioxiánsai, az aszkorbinsav és a glutation mennyiségének és redox állapotának alakulását a közel-izogén árpavonalakban a lisztharmat-fertőzés utáni negyedik és hetedik napokon. Egyik esetben sem mértünk jelentős változást a fertőzés hatására a korábbi időpontban, azaz a negyedik napon (15.A. és 16.A. ábra). A legkésőbbi, általunk vizsgált időpontban, a hetedik napra azonban egy közel 50%-os emelkedést tapasztaltunk a fogékony növények glutation-tartalmában, azonban a redox állapot itt sem változott (16.B. ábra).



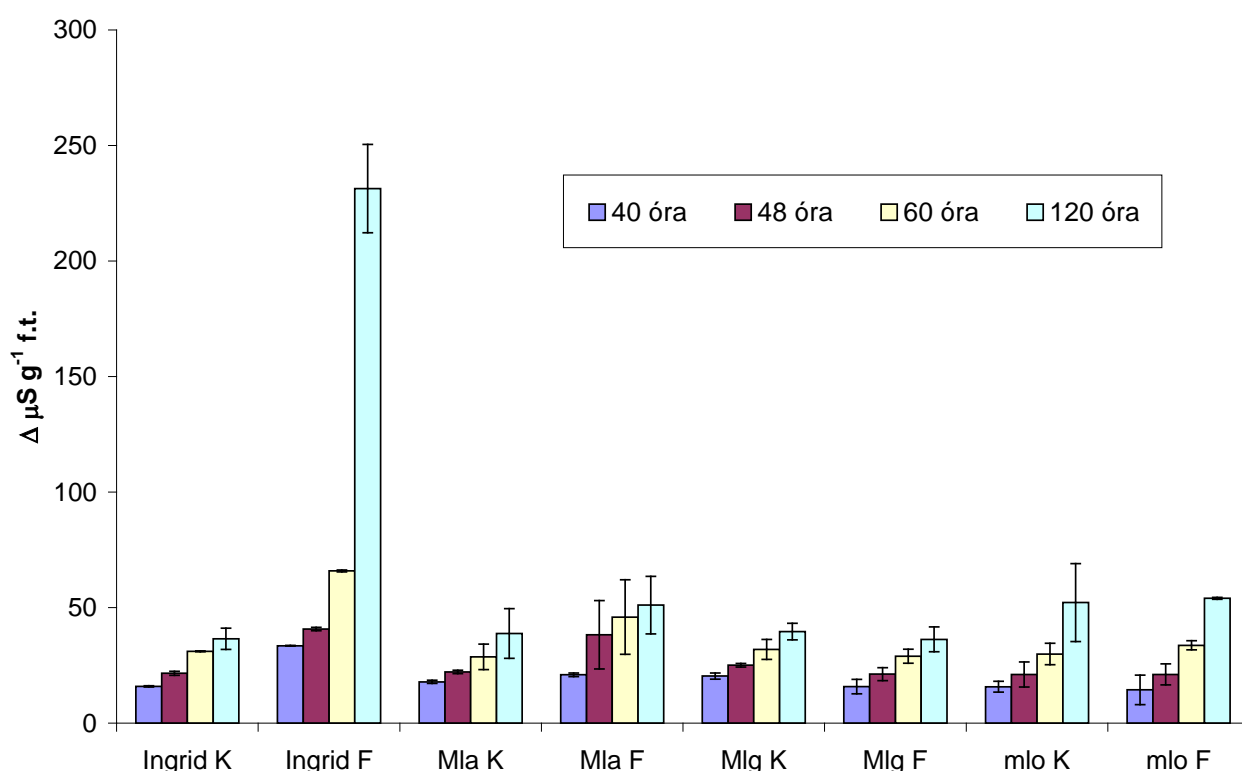
15. ábra. Aszkorbinsav-tartalom árpalevelekben 4 nappal (A) és 7 nappal (B) lisztharmat-fertőzést követően. A redukált aszkorbát (sötét oszlopok) és az oxidált dehidroaszkorbát (világos oszlopok) mennyiségét spektrofotometriásan határoztuk meg fertőzetlen kontroll (K) és lisztharmat-fertőzött (F), fogékony 'Ingrid' (Ing.) és rezisztens (Mla, Mlg, mlo) közel-izogén árpavonalakban.



16. ábra. Glutation-tartalom árpalevelekben 4 nappal (A) és 7 nappal (B) lisztharmat-fertőzést követően. A glutation redukált (sötét oszlopok) és oxidált (világos oszlopok) formáinak mennyiségét spektrofotometriásan határoztuk meg fertőzetlen kontroll (K) és lisztharmat-fertőzött (F), fogékony 'Ingrid' (Ing.) és rezisztens (Mla, Mlg, mlo) közel-izogén árpavonalakban.

5.3.4. Elektrolit-kiáramlás

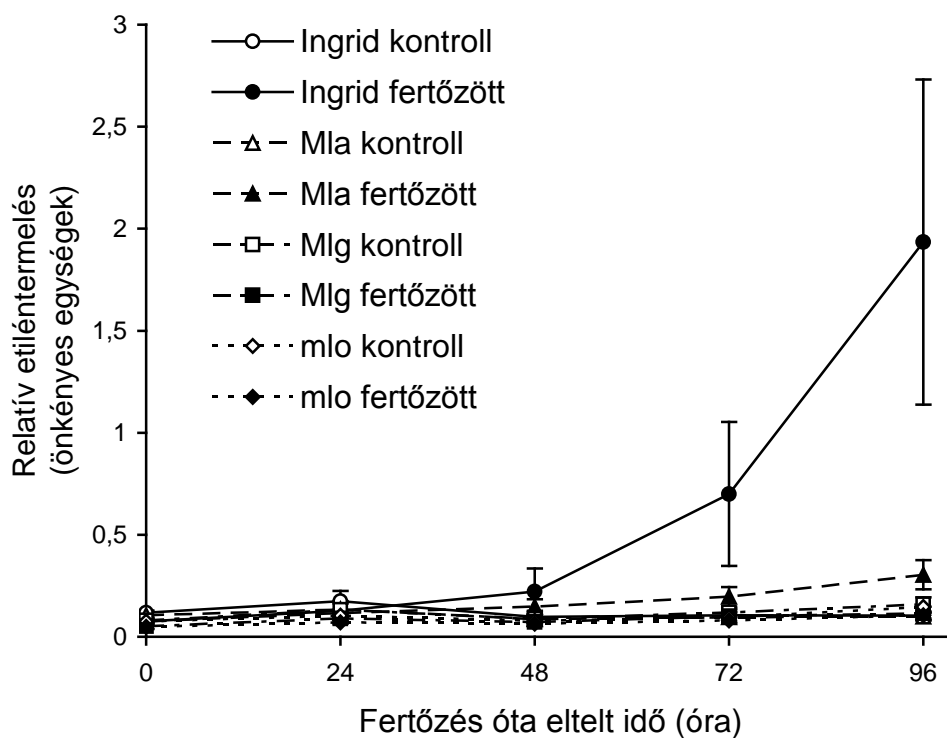
A lisztharmat-fertőzött fogékony 'Ingrid' levélszeletekből az ion-kiáramlás már 40 órával a fertőzés után kétszerese volt a fertőzetlen kontrollból mért értéknek, és a fertőzést követő ötödik napra ez a különbség nyolcszorosra növekedett (17. ábra). Az Mla levelek esetében csak enyhe növekedés volt megfigyelhető a fertőzés hatására, az Mlg és mlo vonalakban pedig nem tapasztaltunk változást. A csak fertőzetlen levelekből mért ion-kiáramlást tekintve megfigyeltük, hogy az egészséges mlo levélszeletek esetében nagyobb kiáramlás jelentkezett a kísérlet végére, mint a másik három genotípusú árpából, ami szintén az mlo levelek korai szenescenciájára utal.



17. ábra. Elektrolit-kiáramlás fertőzetlen kontroll (K) és lisztharmat-fertőzött (F) fogékony (Ingrid) és rezisztens (Mla, Mlg, mlo) közel-izogén árpavonalak leveleiből.

5.3.5. Etilén-kibocsátás

Az etilén stresszhormon termelődésének fokozatos, exponenciális növekedését mértük a fertőzés során már a második naptól a lisztharmat-fertőzött fogékony Ingrid árpában, és kisebb mértékben ugyan, de az Mla-típusú rezisztens vonalban is (18. ábra). Sem az Mlg, sem az mlo árpában nem tapasztaltunk ilyen változást.

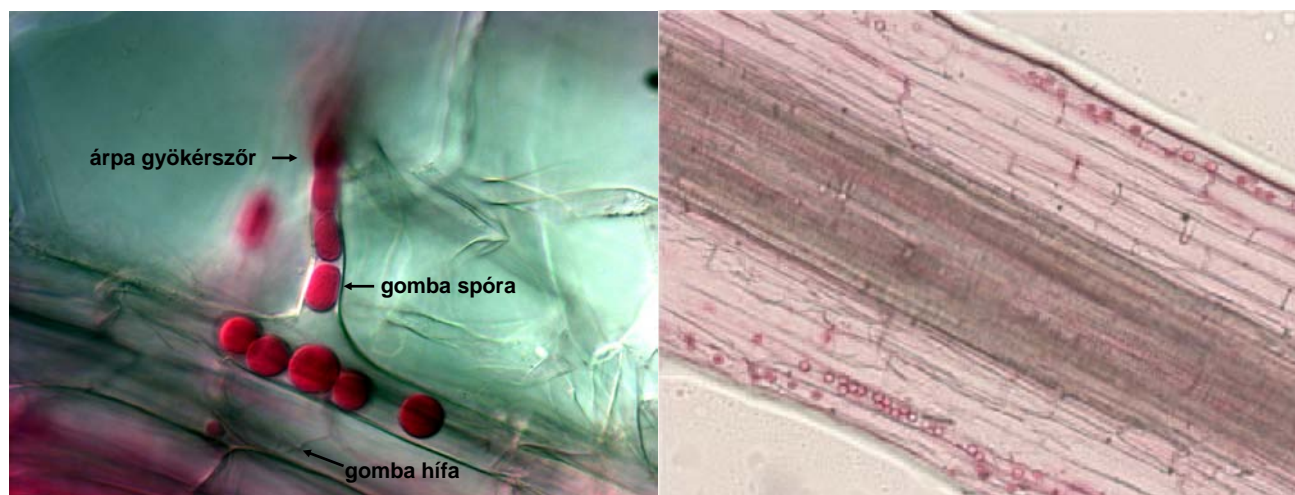


18. ábra. Etilén-kibocsátás lisztharmat-fertőzött közel-izogén árpavonalakban (fogékony Ingrid, rezisztens Mla, Mlg, mlo) és ezeknek megfelelő fertőzetlen kontroll növényekben.

5.4. Indukált rezisztencia

5.4.1. A *P. indica* növekedés-serkentő hatása sóstressz alatt is érvényesül

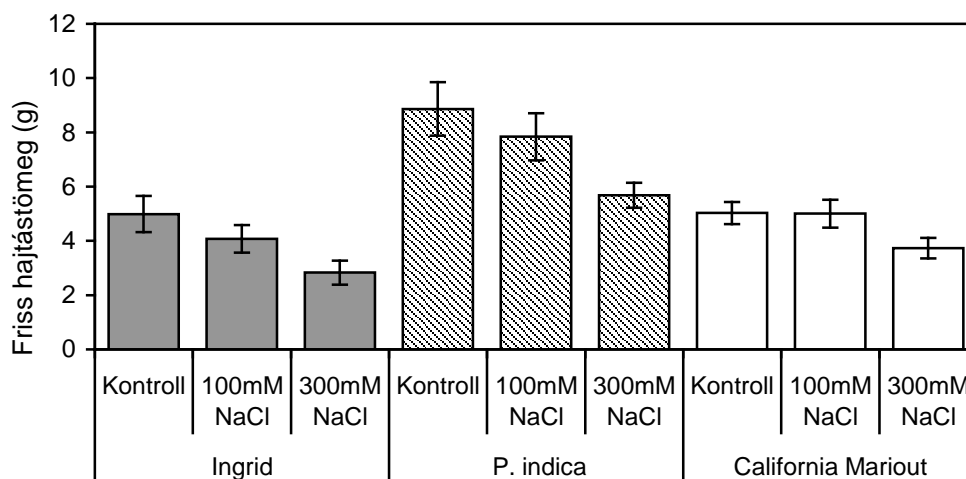
P. indica-val kezelt 'Ingrid' árpaiban a gyökér-kolonizáció mértékét 50-60 százalékosnak találtuk. Kísérleteinkben csak az ellenőrzött hífakkal átszőtt gyökérszövetű növényeket használtuk (19. ábra). A kolonizáció mértékét nem változtatta meg szignifikánsan a 3 hétig tartó sóstressz.



19. ábra. *Piriformospora indica* gomba hifái és névadó, körte alakú klamidospóriái árpa gyökerében (Waller *et al.* 2005). A gomba képleteit 0,01% (w/v)-os savas fukszinnal laktoglicerinben történt festés teszi láthatóvá.

Két héten keresztül sótartalmú vízzel öntözött árpa növekedésében visszamaradt, és korai öregedésnek indult. A legfiatalabb (legfelső) kifejlett levelek friss tömege kismértékben csökkent a sókezelés hatására, míg az idősebb leveleken sárgulás, majd később elhalás jelentkezett. Közepes sóstressz (100 mM NaCl) enyhe, de nem szignifikáns csökkenést eredményezett az árpa hajtások súlyában. Ugyanakkor, magas só-koncentrációnál (300 mM NaCl) lényeges hajtástömeg-csökkenés következett be mind a három vizsgált kezelésben: nem-kolonizált sóérzékeny 'Ingrid', *P. indica*-kolonizált 'Ingrid', és sótűrő 'California Mariout' fajtájú növényekben (20. ábra).

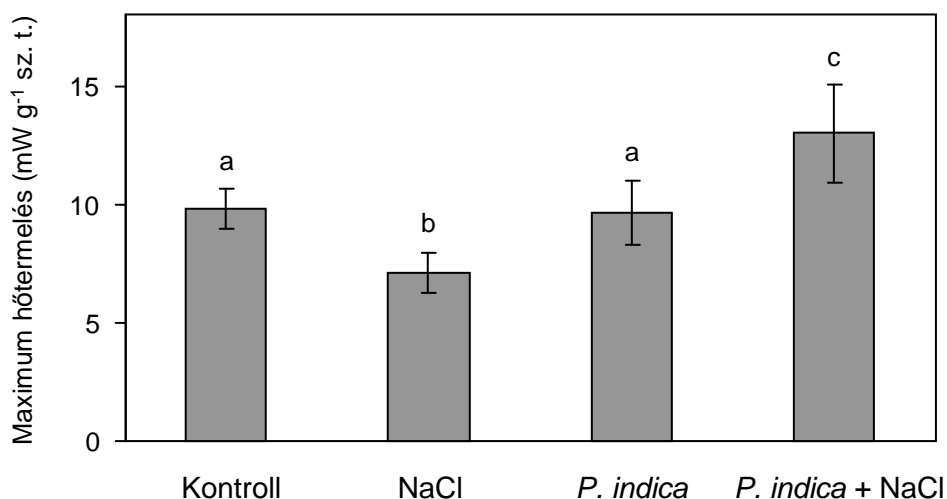
Nem-kolonizált növényekkel összehasonlítva, 'Ingrid' hajtások friss tömege a *P. indica*-kezelés hatására kb. kétszeresére növekedett mind kontroll, mind pedig sós körülmények közt (20. ábra). Még a 300 mM-os NaCl-dal kezelt *P. indica*-kolonizált növények is a kontroll körülmények között tartott, nem-kolonizált növényekhez hasonló friss hajtástömeget fejlesztettek. Magas só-koncentrációnál a sótoleráns cv. California Mariout hajtástömege szignifikánsan nagyobb volt, mint a nem-kolonizált cv. Ingridé, de a legnagyobb hajtástömeg-termelés a *P. indica*-kolonizált Ingrid növények esetében volt megfigyelhető.



20. ábra. Három hetes kora óta sókezelt (100 vagy 300 mM NaCl) vagy kezeletlen (Kontroll) árpa friss hajtástömege öt hetes korban. Ingrid: sóérzékeny árpafajta, P. indica: Ingrid árpa *Piriformospora indica*-val kolonizált egyedei, California Mariout: sőtűrő fajta.

5.4.2. A *P. indica* ellensúlyozza a sókezelés okozta hőtermelés-csökkenést

Ingrid árpalevelek metabolikus hőtermelése kb. 30%-kal csökkent két hetes, 300 mM NaCl-kezelés hatására (21. ábra). A gyökerek *P. indica*-kolonizációja nem okozott jelentős változást a hőtermelésben nem-sós körülmények között. Magas só-koncentrációnál azonban a *P. indica*-val kezelt 'Ingrid' árpa hőtermelése szignifikánsan ($P < 0,05$) meghaladta a nem-kolonizált növényekét.



21. ábra. Sókezelés hatása kalorimetriával mért metabolikus hőtermelésre öt hetes árpalevélben. Kontroll: kezeletlen 'Ingrid' árpa, NaCl: három hetes koruk óta 300 mM sóoldattal öntözött növények, P. indica: Ingrid árpa *Piriformospora indica*-val kolonizált egyedei.

5.4.3. Változások a zsírsav-összetételben

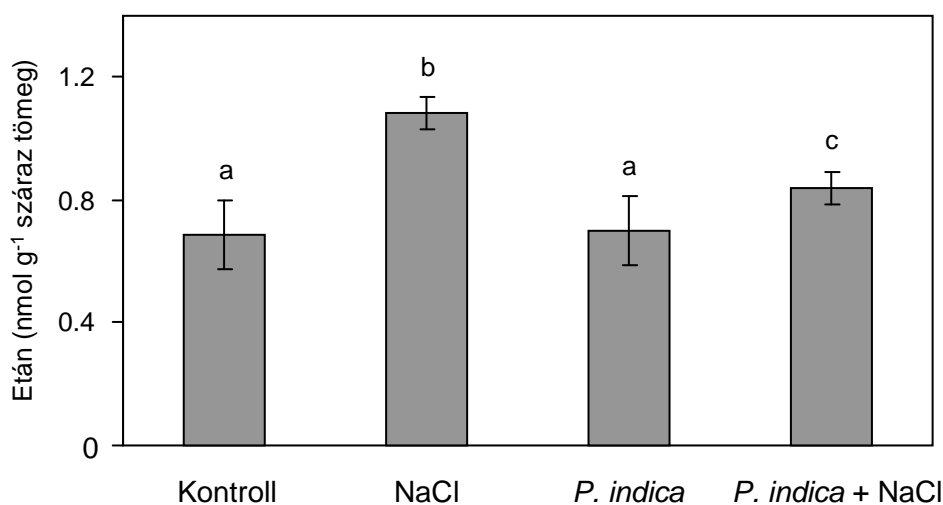
A sóérzékeny 'Ingrid' árpa leveleiből kivont foszfolipid-frakció zsírsav-összetételét a 6. táblázatban tüntettük föl. A fő zsírsavak a palmitinsav (C16:0), palmitinolajsav (C16:1), sztearinsav (C18:0), olajsav (C18:1), linolénsav (C18:2) és linolsav (C18:3) voltak. A 16 szénatomos zsírsavak közül a teljesen telített C16:0 palmitinsav dominált, míg a C18 zsírsavaknak a telítetlen fajtái fordultak elő legnagyobb mennyiségben. Nagy töménységű sókezelés hatására enyhén eltolódott az arány a C16 zsírsavak felől a C18:3 zsírsav javára. Ezzel a változással együtt kismértékben, de szignifikánsan növekedett a telítetlen zsírsavak teljes aránya, a C18:3/C18:2 arány, valamint a kettős kötés mutató (*double bond index*, DBI), ami a zsírsavak telítetlenségét még pontosabban fejezi ki. *P. indica*-kolonizált árpalevelekben a C16:1 zsírsav aránya megnőtt, míg a C18:1 zsírsav mólszázaléka szignifikánsan csökkent a nem kolonizált növényekhez képest. A linolénsav aránya és a zsírsav telítetlenségi mutatók enyhén megemelkedtek az endofita gombát tartalmazó növényekben. Érdekes módon a sónak kitett *P. indica*-kezelt 'Ingrid' árpában nem változott már a C16 vagy C18 zsírsavak mólszázaléka, kivéve a C16:1-et, amelyiké lecsökkent a sókezelt, nem kolonizált növényekben mért szintre.

6. táblázat. Zsírsav-összetétel (mólszázalékban) 5 hetes 'Ingrid' árpa elsődleges leveleiből izolált foszfolipid-frakcióban 300 mM-os só-kezelés mellett (NaCl) vagy anélkül (Kontroll), illetve *Piriformospora indica*-kolonizációval (*P. indica*). 18:3/18:2 (linolénsav/linolsav arány), U/S (telítetlen/telített zsírsav arány), DBI (*double bond index*, kettős kötés mutató) = $\sum (\text{mol \% zsírsav} \times \text{kettős kötések száma})/100$.

Zsírsav	Kontroll	NaCl	<i>P. indica</i>	<i>P. indica</i> + NaCl
16:0	16,9 ± 0,7	15,4 ± 0,7*	15,8 ± 1,0	16,3 ± 1,1
16:1	2,3 ± 0,2	1,8 ± 0,4	2,8 ± 0,2*	1,9 ± 0,4
18:0	2,4 ± 0,5	2,3 ± 0,3	2,2 ± 0,5	2,3 ± 0,6
18:1	2,7 ± 0,2	2,5 ± 0,2	1,9 ± 0,3*	2,2 ± 0,1*
18:2	25,9 ± 2,2	23,0 ± 1,2	22,6 ± 4,1	23,1 ± 0,9
18:3	49,9 ± 2,5	55,0 ± 1,9*	54,7 ± 5,6	54,1 ± 2,5*
18:3/18:2	1,95 ± 0,25	2,39 ± 0,19*	2,47 ± 0,70	2,32 ± 0,19*
U/S	4,17 ± 0,29	4,65 ± 0,28*	4,54 ± 0,39	4,33 ± 0,46
DBI	2,06 ± 0,04	2,15 ± 0,04*	2,13 ± 0,08	2,12 ± 0,06

5.4.4. A *P. indica* csökkenti a sókezelt árpa lipid-peroxidációját

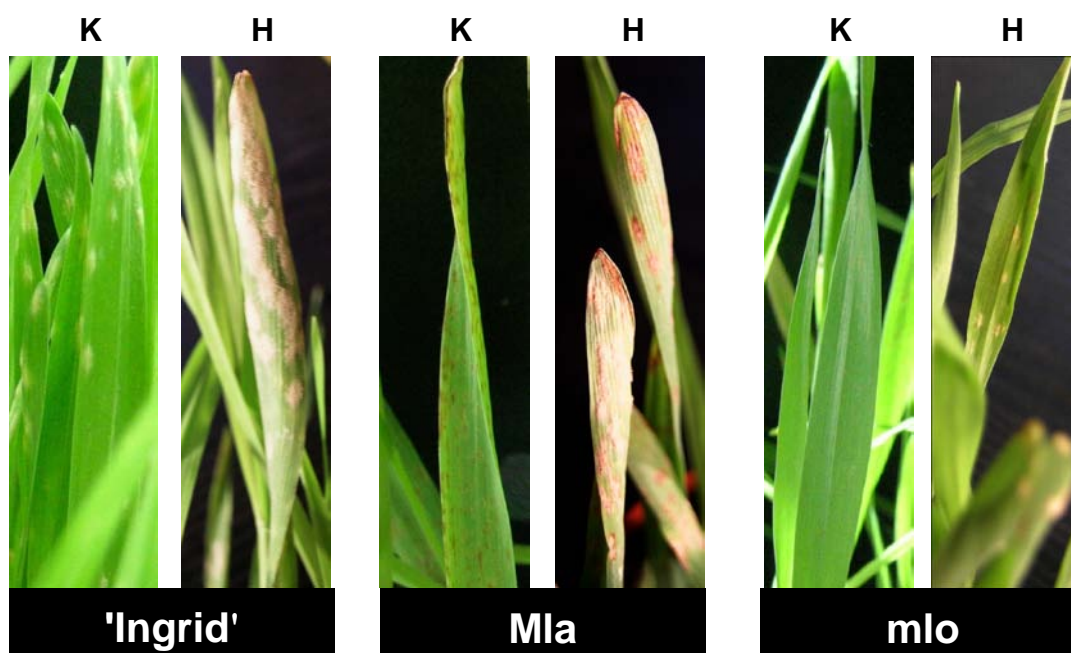
Magas só-koncentráció hatására fokozódott az 'Ingrid' levelekben a lipid-peroxidáció, amint ezt a hőkezeléssel serkentett etán-termelődéssel kimutattuk (22. ábra). A *P. indica*-kezelés önmagában nem befolyásolta az etán-kibocsátás mértékét. A sós öntözés hatására azonban közel 60%-os emelkedést figyeltünk meg a nem sózott kontroll etán-kibocsátásához képest, de csak a szimbiózist nélkülözni kényszerülő növényekben. A *P. indica*-kolonizáció mellett ugyanis csak 20%-os növekedés következett be a sótlan kontrollhoz képest.



22. ábra. Sókezelés hatása az etán-termelődéssel jellemzett lipid-peroxidáció mértékére öt hetes árpalevélben. Kontroll: kezeletlen 'Ingrid' árpa, NaCl: három hetes koruk óta 300 mM sóoldattal öntözött növények, *P. indica*: Ingrid árpa *Piriformospora indica*-val kolonizált egyedei.

5.5. Hősokk

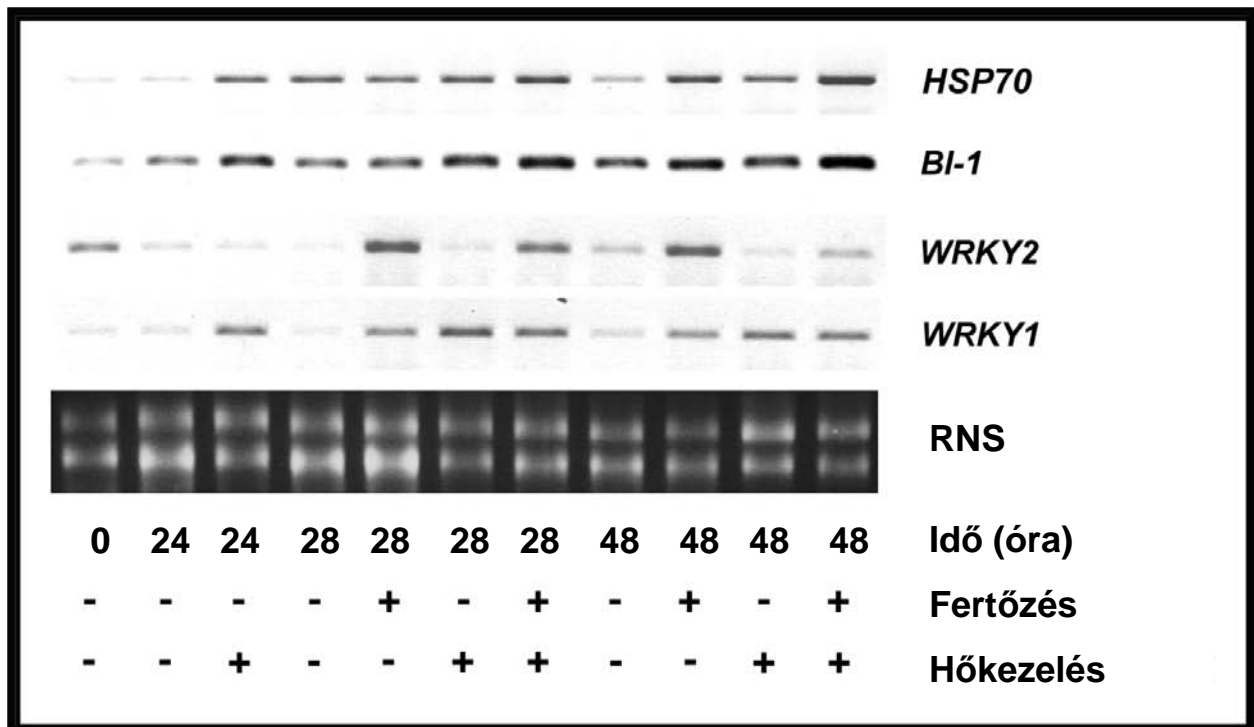
Hősokk alkalmazásával fogékonytágot indukáltunk árpában. A fogékony 'Ingrid' fajta még fogékonyabbá vált a kezelés hatására, azaz több sporuláló lisztharmat-telepet találtunk a hősokknak kitett, majd fertőzött elsődleges leveleken (23. ábra). A több sejtre kiterjedő HR-rel kísért rezisztenciával rendelkező Mla árpán nagyobb kiterjedésű nekrotikus foltok és sporuláló lisztharmat-telepek is megjelentek (23. ábra). A szabad szemmel nem látható, egy-egy sejtet érintő HR-elhalásokkal járó Mlg rezisztenciát is letörte az általunk alkalmazott hősokk, és a lisztharmat szaporodott a leveleken (fénykép nélkül). A legmeglepőbb eredmény azonban a széleskörű, nem rassz-specifikus rezisztenciát kialakító *mlo* gént hordozó árpavonal sikeres lisztharmat-fertőzése volt (23. ábra).



23. ábra. Lisztharmat-fertőzés tünetei fogékony ('Ingrid') és rezisztens (Mla, mlo) árpavonalak hősokknak (45 mp, 49°C) kitett (H), illetve nem előkezelt (K), elsődleges levelein.

Lisztharmat-fertőzést követő génkifejeződés-változásokat vizsgáltunk RT-PCR-technikával, a hőkezeléssel lisztharmat-fogékonytá tett mlo árpában (24. ábra). A Hsp70 hősokk-fehérje RNS-szintű átíródása additív módon indukálódott a két kezelés (hősokk és lisztharmat-fertőzés) hatására. Hasonlóképpen alakult a BI-1 (Bax Inhibitor-1, a programozott sejthalált gátló fehérje) kifejeződése is. Ezen kívül vizsgáltuk két WRKY fehérje (a növények kórokozók elleni védekezésében és

stressz-válaszaiban is szerepet játszó transzkripciós faktorok) kifejeződését, és azt találtuk, hogy a *WRKY1* gén transzkripcióját a fertőzés gyengébben, a hőkezelés erősebben indukálta, az együttes hatás viszont gyengébb indukciót eredményezett, mint csak a hőkezelés, azaz a fertőzés csökkentette a hőkezelés hatását. A *WRKY2* gén átíródása pedig csak a fertőzés hatására indukálódott, és érdekes módon a két kezelés együttes hatása gyengébb volt, mint a fertőzésé egyedül, azaz itt meg a hőkezelés csökkentette a fertőzés hatását.



24. ábra. Génkifejeződés változások mlo-típusú lisztharmat-rezisztens árpalevelekben hősokk-kezelést és/vagy lisztharmat-fertőzést követően. A szemikvantitatív RT-PCR módszerrel felszaporított cDNS-szakaszokat agaróz gél-elektroforézises szétválasztást és etídium-bromidos festést követően ibolyántúli (UV) fényben lefényképeztük. Az ábrán a fényképek inverze látható.

Referenciaként az összes kivont RNS mennyiséget használtuk (RNS).

5.6. Új tudományos eredmények

5.6.1. Fiatal és öreg, illetve citokinin juvenilhormont túltermelő transzgenikus és vad típusú dohánylevelek higany-klorid által kiváltott oxidatív stressz, illetve közvetlenül ROF (hidrogén-peroxid) okozta membrán-károsodásának összehasonlításával igazoltuk a juvenilis élettani állapottal együtt járó magasabb antioxidáns kapacitás védő hatását abiotikus oxidatív stresszel szemben.

5.6.2. Xanthi-nc és szalicilsav-hiányos NahG dohány TMV-fertőzésre megváltozó hőtermelés-intenzitását és etán-kibocsátását hasonló mértékűnek találtuk. Csak fertőzetlen állapotban mutattunk ki metabolikus és lipid-peroxidációs különbségeket az SzSzR-re képes és képtelen vonal között: mindkét vizsgált paraméter értéke az utóbbiban, azaz a transzgenikus NahG dohányban volt kisebb.

5.6.3. Az antioxidáns-szintek indukálódása erősebb volt liztharmat-fertőzésre fogékony 'Ingrid' árpafajtában, mint az *Mla*, *Mlg* vagy *mlo* rezisztenciagént hordozó, közel-izogén vonalaiban. A hidrogén-peroxid tartalom viszont a rezisztens vonalakban nőtt meg jelentősen. Eredményeink így alátámasztják azt a feltevést, miszerint a kórokozó a fogékony kapcsolatban indukálhatja a növényben az antioxidánsokat, az ellene képződött ROF káros hatásának kiküszöbölésére.

5.6.4. *Piriformospora indica* gyökér endofita gombával való szimbiotikus kapcsolat enyhítette a sókezelés okozta, anyagcsere aktivitással, zsírsav-összetétel alakulásával és lipid-peroxidációval jellemzett károkat sóérzékeny árpában.

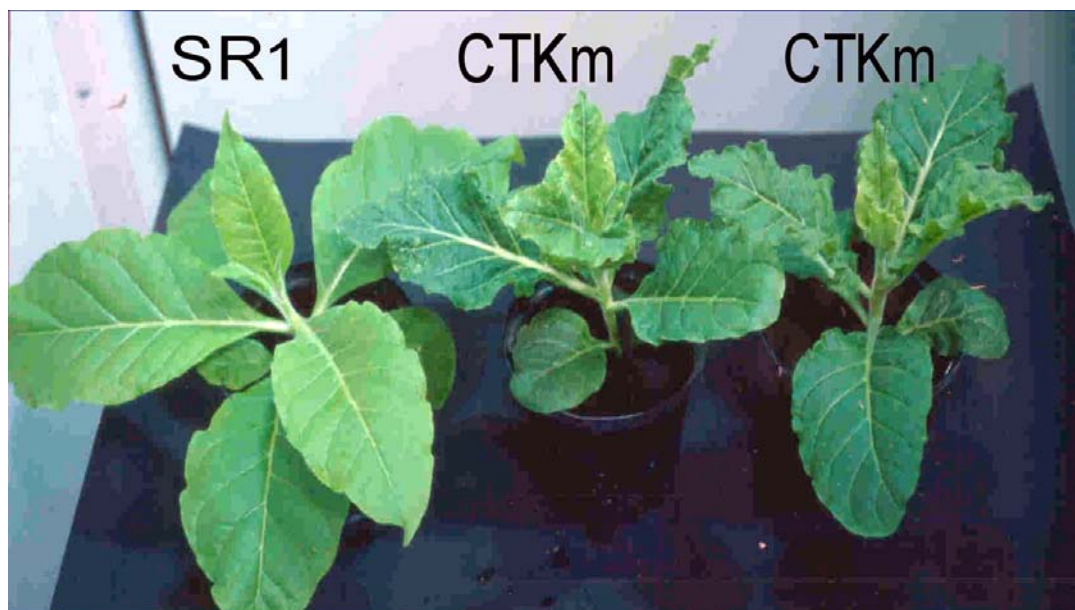
5.6.5. Árpában a hőkezeléssel indukált liztharmat-fogékonyság összefüggéseket mutatott egyes abiotikus és biotikus stressz-válaszokban szerepet játszó gének (*BI-1*, *HSP70*, *WRKY1*, *WRKY2*) RT-PCR-módszerrel vizsgált kifejeződésének indukciójával illetve repressziójával.

6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

6.1. A magasabb fokú abiotikus stressztűrő-képesség és a juvenilitás kapcsolata

Korábbi eredmények szerint a fiatal növényi levelek az öregeknél ellenállóbbaknak bizonyultak nekrotróf kórokozók által okozott biotikus stresszel szemben (Barna és Györgyi 1992), ezért megvizsgáltuk a szenescencia hatását abiotikus stressz, mint nehézfém-ion, és közvetlen oxidatív stressz esetében. Bizonyos fémionok károsan magas koncentrációban megváltoztatják a növényi sejtmembránok áteresztő-képességét, s ez ion-kiáramláshoz, valamint a pigmentek roncsolódásához vezet. A higany-klorid mint nehézfémstressz nem csak közvetlenül toxikus és a növények növekedését gátolja, hanem oxidatív stresszt alakít ki a növényekben reaktív oxigénformák képződésén keresztül. Fiatal és öreg 'Samsun' dohányleveleket tettünk ki oxidatív stressznek külsőleg alkalmazott higany-klorid illetve hidrogén-peroxid kezeléssel. A membrán épségének mértékét, ami a növényi sejtek különféle abiotikus stressztényezők által okozott oxidatív károsodását jól jellemzi, ion-kiáramlás módszerrel vizsgáltuk. A higany-klorid kezeléssel átesett fiatal dohánylevelekből az elektrolit-kiáramlás gyengébb volt a vízzel álkezelte kontrolljaikhoz viszonyítva, mint az öregekből. Hasonló eredményt kaptunk a közvetlen oxidatív stresszt okozó hidrogén-peroxid oldaton való úsztatáskor, ebben az esetben is a membrán-károsodás és így az ion-kiáramlás is alacsonyabb volt a fiatal levelekből, mint az öregekből. Megfigyeltük, hogy a nagyobb mértékű toleranciával párhuzamban a hidrogén-peroxidot közömbösítő kataláz enzim aktivitása 'Samsun' dohány fiatal leveleiben kétszerese volt az öreg levelekben mértnek. A ROF közömbösítésének egy másik kulcsenzime, a szuperoxid-dizmutáz pedig 50%-kal nagyobb aktivitást mutatott a fiatal levelekben az öregekhez képest, ami összhangban van a fiatal levelek nagyobb antioxidáns kapacitásával.

Következő kísérleteinkben az SR1 dohányfajtát és annak transzgenikus CTKm vonalát hasonlítottuk össze. A CTKm dohányban a folyamatos génkifejeződést biztosító konstitutív promóter után beépített *ipt* gén az izopentenil-transzferáz enzimet kódolja. Ez a citokinin-bioszintézis egyik kulcsenzime, így a CTKm dohányokra állandó citokinin-túltermelés jellemző. A citokinin növényi hormon serkenti a sejtsztódást, a sejt differenciálódást, gátolja az apikális dominanciát (auxinnal együtt hatva), gátolja a klorofill lebontását, szabadgyököket közömbösít és a tápanyag-transzportot a citokininben gazdag növényi részek felé irányítja (Jameson 2000, Mok és Mok 2001). Ebből következően a CTKm növényeknek hosszasan megmarad juvenilitásuk, valamint növekedési eltérések mutatkoznak rajtuk a kontroll fajtához képest (25. ábra).



25. ábra. 'Petit Havana SR1' dohányfajta (SR1) és citokinin-túltermelő transzgenikus vonalának (CTKm) fenotípusos különbsége nyolc hetes korban.

Az öregedésében gátolt CTKm dohány szöveteit kevésbé károsította a külsőleg adagolt hidrogén-peroxid, vagyis gyengébb ion-kiáramlást mértünk, mint a kontroll, nem transzgenikus SR1 fajta esetében. Csoportunk korábbi munkájában kimutatta, hogy a CTKm dohányban is fokozott antioxidáns enzimaktivitás tapasztalható, ami minden bizonnyal szerepet játszik a nagyobb mértékű stressz-toleranciában (Pogány *et al.* 2004).

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a fenti eredmények alátámasztották feltételezésünket, miszerint a magasabb antioxidáns kapacitással bíró, juvenilis növényi szövetek jobban tűrik az abiotikus eredetű oxidatív stressz okozta károkat.

6.2. A szalicilsav szerepe dohány szisztémikus szerzett rezisztenciájában

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy 'Xanthi-nc' dohánylevelek TMV-fertőzése a szalicilsav mennyiségének helyi és szisztémikus növekedését idézi elő, valamint a hőtermelésre, lipid-peroxidációra és zsírsav-összetételre is hatással van (Ádám *et al.* 1990, 1993, Enyedi *et al.* 1992, Malamy *et al.* 1990). Munkánk célja az volt, hogy a szalicilsav szerepét jellemezzük ezekben a metabolikus válaszokban a szalicilsav-hiányos, transzgenikus NahG dohányvonal segítségével. A NahG dohány nagy mennyiségben termeli a *Pseudomonas putida* baktériumból származó *nahG* gén által kódolt szalicilsav-hidroxiláz enzimet. A szalicilsav-hidroxiláz a szalicilsavat katekollá (1,2-dihidroxi-fenol) alakítja, s ennek eredményeként a NahG dohányban a szalicilsav mennyisége nem tud megnőni (Gaffney *et al.* 1993).

A TMV-vel fertőzött dohánylevelek anyagcsere aktivitásának változásait a hőtermelés izotermális kalorimetriával történő mérésével követtük. Az etán termelődését, ami a lipid-peroxidáció általánosan alkalmazott indikátora, gázkromatográfiával mértük. Az etán illékony bomlástermék, ami az ω -3 telítetlen hidroperoxi-zsírsavak degradációja során szabadul fel (Dumelin és Tappel 1977). Mivel a membránok kulcsszerepet játszanak a növényi sejtek HR-jában (Yaeno *et al.* 2004), a foszfolipid-frakció zsírsav-összetételét és a szterol-összetételt is meghatároztuk gázkromatográfiával. A Xanthi és a transzgenikus NahG dohánynövények TMV-fertőzésre adott metabolikus válaszának összehasonlító elemzése hozzájárulhat a szalicilsavnak a TMV-indukálta SzSzR-ban játszott hatásmechanizmusának jobb megértéséhez. Így lehetőség nyílik a természetes úton keletkezett szalicilsavnak a Xanthi-nc dohány TMV-fertőzéssel szemben adott, fentiekben említett anyagcsere válaszára gyakorolt hatásának értékelésére.

Raskin és munkatársai (1989) kimutatták, hogy az endogén szalicilsavszint emelkedése szabályozó szerepet játszik a hőtermelésben virágzás idején a kontyvirág virágzatában. Ugyanígy a szalicilsav szintjének megemelkedése a TMV-vel fertőzött Xanthi-nc dohánynövényekben is hőtermeléssel és energiavesztéssel jár (Ádám *et al.* 1993). Megfigyelték azt is, hogy akár külsőleg adagolt (Anderson *et al.* 1998), akár TMV-fertőzés nyomán felhalmozódott (Montillet *et al.* 2002) magas szalicilsavszint a lipid-peroxidáció fokozódását indukálja dohányban. Továbbá *Arabidopsis thaliana*-ban a szalicilsav a 16 és 18 szénatomos zsírsavakat oxidáló, α -dioxigenázt kódoló *αDOX1* gén expresszióját aktiválja (De León *et al.* 2002). A lipid-összetétel tekintetében a zsírsavak telítettségi szintje búzanövényekben a hidegedzés során a szalicilsav-tartalom emelkedésével párhuzamosan csökken (Janda *et al.* 2007b). A lipidek és a lipid-összetevők dinamikájának szerepét a növények SzSzR-jában *A. thaliana* genetikai vizsgálata is megerősítette azáltal, hogy a zsírsav-deszaturáz enzim aktivitását kimutatta (Nandi *et al.* 2004). Ezek a kísérletek azt bizonyítják, hogy a szalicilsav szerepet játszik a hőtermelés, a lipid-peroxidáció és a lipid-összetétel alakulásában is.

Kimutatták, hogy a zsírsavak telítetlenségének szintjét Xanthi növényekben a SzSzR indukciója nem befolyásolja (Ádám *et al.* 1990). A Xanthi növényhez képest a NahG transzgenikus növényekben a C18:3 zsírsavak 8%-kal kisebb mennyiségét és a C18:3-nak a C18:2-höz viszonyított 16%-kal alacsonyabb arányát figyeltük meg. Említést érdemel, hogy az antiszensz fad7 Xanthi-nc dohányvonalban a 15–20%-kal csökkent trién zsírsav-tartalom esetén a TMV által okozott elhalásos léziók kb. kétszer akkor kiterjedésűek lettek, mint a vad típusú növényben (Im *et al.* 2004). Hasonlóképpen kimutatták, hogy a foszfolipid-frakció zsírsavai között a linolénsav moláris aránya is kb. 20%-kal csökkent a TMV-fertőzött Xanthi-nc levelekben (Ruzicska *et al.* 1983). Ám Ruzicska és munkatársai (1983) a vírussal fertőzött levelekben az összefüggő nekrosis kialakításához 33°C-ról 25°C-ra történő hőmérséklet-változást alkalmaztak. A mi kísérleti

körülményeink között a TMV-fertőzés sokkal enyhébb nekrotikus tüneteket okozott, és ezzel párhuzamosan nem idézett elő szignifikáns változást a zsírsav-összetételben sem.

NahG növények TMV-vel fertőzött leveleiben a sztigmaszterol szitoszterolhoz viszonyított arányának emelkedését figyeltük meg. Mivel a sztigmaszterol/szitoszterol arány emelkedése kíséri a dohánylevelek öregedését is (Grunwald 1978, Barna és Györgyi 1992), eredményeink arra utalnak, hogy NahG növényekben a TMV-fertőzés szenescenciát idéz elő. A lipid-összetétel változásai a membránok fluiditását és áteresztő-képességét is befolyásolhatják, de fluoreszcencia polarizációs méréseink kimutatták (Fodor *et al.* 2007), hogy kezeletlen Xanthi és NahG, valamint SzSzR-rel már rendelkező Xanthi növények levelei megőrizték megfelelő membrán fluiditásukat. Ugyanígy a SzSzR kiváltása Xanthi dohánynövényekben szintén nem okozott szignifikáns változást a felsőbb, fertőzésmentes levelekből készült protoplaszt fluiditásában (Ádám *et al.* 1990).

A lipid-peroxidáció és hőtermelés a dohánynövények TMV-fertőzésre adott HR-jának ismert kísérőjelensége. A szalicilsav lipid-peroxidációban és hőtermelésben játszott szerepének jobb megvilágítása céljából az etán- és hőkibocsátás mértékét SzSzR-t mutató, Xanthi dohánynövények és SzSzR-válaszra képtelen, transzgenikus NahG dohánynövények TMV-vel fertőzött leveleiben vizsgáltuk. Ez a rendszer jól használható a dohány TMV-fertőzésre adott, szalicilsav által közvetített, illetve szalicilsavtól független válaszainak elemzésére.

Korábban kimutatták, hogy a TMV-vel fertőzött dohánylevelekben a HR tünetek súlyossága szoros kapcsolatban áll a lipid-peroxidációval (Montillet *et al.* 2002). Ezzel szemben mi azt találtuk, hogy Xanthi és NahG dohánynövények TMV-vel fertőzött leveleiben hasonló mértékű volt az etán-kibocsátás mérésével detektált lipid-peroxidáció. Ráadásul az etán-kibocsátás hasonló volt az elsődleges vagy másodlagos TMV-fertőzésen átesett Xanthi növények esetében is, holott mi arra számítottunk, hogy a lipid-peroxidáció csakúgy, mint a HR tünetek, a SzSzR kialakulása után csökkenni fog a dohánynövényekben. Ezek az eredmények megerősítik azokat a korábbi megfigyeléseket, amelyek arra utaltak, hogy a szalicilsav oxidatív stresszt alakít ki és a reaktív oxigénformákkal karöltve fokozza a programozott sejthalált (Alvarez 2000, Shirasu és Schulze-Lefert 2000). Ennek megfelelően a Xanthi dohánynövényekben TMV-fertőzéssel aktivált SzSzR egy-egy sejtnyi, mikroszkopikus elhalásokat indukált a fertőzetlen levélterületeken és a fertőzés helyétől távolabb elhelyezkedő leveleken is (Alvarez *et al.* 1998, Balázs *et al.* 1977). Eredményeink arra utalnak, hogy a szemmel látható nekrotikus foltok mellett a csupán egyetlen sejtre kiterjedő elhalások is forrásai lehetnek az etán-kibocsátásnak. Ezt a feltételezést támasztja alá az a tény is, hogy a szalicilsav, illetve ennek biológiailag aktív analógjai a dohány lipid-peroxidációjának fokozódását dózistól függő módon indukálják (Anderson *et al.* 1998). Ráadásul a NahG növényekben a fertőzetlen levelekből felszabaduló etán mennyisége 30%-kal kisebb volt, mint a Xanthi dohányban. Ezzel az eredménnyel összhangban van az a megfigyelés, miszerint a katekol

emlőssejtekben a lipoxigenáz enzim aktivitásnak hatásos inhibitora (Simpson *et al.* 2003). A megemelkedett lipoxigenáz aktivitás jellemző a HR-el reagáló dohánynövények TMV-vel fertőzött leveleire (Ruzicska *et al.* 1983), a lipoxigenáz által közvetített lipid-peroxidációról pedig kimutatták, hogy a TMV-vel fertőzött Xanthi dohánylevelekben végbemenő összes lipid-peroxidációnak közel 95%-áért felelős (Montillet *et al.* 2002). Emiatt úgy kell tekintenünk, hogy a HR-t kísérő léziók kialakulása során mind a szalicilsav által közvetített, mind az attól független folyamatok is befolyásolják a TMV-vel fertőzött levelek lipid-peroxidációját.

Fokozott hőtermelést figyeltek meg korábban TMV-vel fertőzött Xanthi-nc dohánynövények leveleiben a TMV által kiváltott nekrotikus foltok kialakulásának idején (Ádám *et al.* 1993, Chaerle *et al.* 1999). Ismert, hogy a TMV-vel fertőzött dohányban a nekrotikus léziók kialakulását fokozott oxigén-felvétel (Chivasa és Carr 1998, Mittler *et al.* 1996, Weintraub *et al.* 1960) és oxidatív kitörés (Allan és Fluhr 1997, Doke és Ohashi 1988) kíséri. Korábban mi is kimutattuk, hogy a saját TMV-dohány rendszerünkben (Fodor *et al.* 2001, Hafez *et al.* 2004, Király *et al.* 2002) az oxidatív kitörés korrelációban van a TMV által kiváltott nekrotikus foltok számával és méretével. A mikoplazmával (*Acholeplasma laidlawii*) fertőzött *Chlorella vulgaris* alga kalorimetriás vizsgálata azt mutatta, hogy az oxigén-felvétel és az oxidatív kitörés szoros összefüggésben áll a hőkibocsátási rátával (Loseva *et al.* 2002).

Jelen munkánkban a laboratóriumunkban régóta folyó kísérleteket terjesztettük ki a SzSzR-t mutató Xanthi-nc, és erre a válaszra képtelen NahG növények vizsgálatba vonásával. A hőtermelés a dohánylevél-szövetekben zajló általános anyagcsere folyamatok intenzitását tükrözi, tehát a kalorimetriával kapott eredményeink mind a szalicilsav-függő, mind pedig az attól független hőtermelést magukba foglalják. A kontroll NahG növények fertőzetlen levelei által kibocsátott hő mennyisége szignifikánsan alacsonyabb volt, mint amennyit a Xanthi dohány termelt. A szalicilsavról kimutatták, hogy egymagában is képes hőkibocsátást indukálni (Raskin *et al.* 1987, 1989). A dohánynövények szalicilsavas kezelése az alternatív légzés stimulálása (Kapulnik *et al.* 1992, Van Der Straeten *et al.* 1995), valamint a proton-grádiens megszakítása (Gordon *et al.* 2004) révén fokozott oxigén-fogyasztást és hőtermelést idézett elő. Dohánysejtek 20 μ M-os szalicilsavval történő inkubálása a hőfejlődés ütemét 60%-kal növelte a kezeletlen kontrollokhoz képest (Kapulnik *et al.* 1992). Említésre méltó, hogy dohányban a TMV által indukált nekrotikus léziók közelében a legmagasabb mért szabad szalicilsavszint 50 μ M körül volt (Enyedi *et al.* 1992). Érdekes, hogy NahG dohányban a szalicilsavhiány hatása szembetűnőbb volt kontroll, fertőzetlen növényekben, mint a TMV-fertőzést követően. Ez arra a tényre való tekintettel is roppant különös, hogy a szalicilsavszint a fertőzetlen növényekben nagyon alacsony, és csak a fertőződés után emelkedik meg (Malamy *et al.* 1990). Ez arra utalhat, hogy a szalicilsav alapszintjének viszonylag kicsi változásai már szignifikáns eltolódást eredményezhetnek az anyagcsere aktivitásban.

Elképzelhető az is, hogy a katekol-termelődés felelős a hőfejlődés gátlásáért, mint ahogy az emlőssejtekben a lipoxigenáz aktivitását is gátolja (Simpson *et al.* 2003). Ez a kérdés azonban további vizsgálatokat igényel.

A TMV-vel fertőzött NahG levelek megemelkedett szintű hőkisugárzása mutatja, hogy a hőtermelés szalicilsavtól független is lehet. Jóllehet mi a TMV-vel történt fertőzés után a dohánylevelekben a hőkibocsátás fokozódását figyeltük meg a fertőzetlen, kontroll növényekhez képest, nem tapasztaltunk figyelemre méltó különbséget a TMV-fertőzött NahG, és az indukált (SzSzR-kifejező) vagy nem-indukált Xanthi dohánynövények között. Másképpen kifejezve, az anyagcserével kapcsolatos hőtermelés szintje ugyanúgy, mint a lipid-peroxidáció, hasonlóképpen alakult a saját endogén szalicilsavszinttel összefüggően enyhébb vagy súlyosabb tüneteket mutató, TMV-vel fertőzött dohánylevelek esetében. Feltételezzük, hogy a NahG dohány esetében a szalicilsav-hiány okozta alacsony hőtermelést az erős oxidatív kitörés ellensúlyozni tudja. Ezzel szemben a Xanthi növényekben a megnövekedett mennyiségű szalicilsav által felfokozott hőkibocsátást a visszaszorított oxidatív kitörés tudja kompenzálni. Ezt a feltételezést laboratóriumunk korábbi eredményei is alátámasztják, melyek szerint minél nagyobb mértékű a TMV-fertőzött dohánylevelekben a szöveti elhalás, annál magasabb a felhalmozódott ROF szintje (Fodor *et al.* 2001, Hafez *et al.* 2004, Király *et al.* 2002). A nemrégiben olajrepcé vizsgálatával kapott adatok szerint inkompatibilis baktériummal szemben kialakuló, 24-epibrassinolid által fokozott válaszreakciókat megemelkedett hőkibocsátás kíséri a kezeletlen növényekhez viszonyítva (Janeczko *et al.* 2007). Ezen túlmenően vad zab biotípusok gyomirtószerrel szembeni rezisztenciája szoros összefüggést mutatott a herbicid-kezelés nyomán kialakuló hőtermelés fokozódásának sebességével (Stokłosa *et al.* 2006). Ezek az eredmények határozottan arra utalnak, hogy a hőtermelés növekedése gyakran jellemző az olyan stressznek kitett növényekre, amelyek a biotikus vagy abiotikus nekrotizáló ágensekkel szemben nagy ellenálló-képességgel rendelkeznek, és az anyagcsere folyamatok aktiválódása szükséges a védekezési mechanizmusokhoz.

Összefoglalva megállapíthatjuk, hogy számos bizonyíték utal arra, hogy a szalicilsav indukálhatja a lipid-peroxidációt és a hőkibocsátást. Emiatt a nekrotikus léziók vizuális vizsgálata félrevezető következtetéseket engedhet levonni a dohánynövényekben kialakult SzSzR hasznosságára vonatkozóan. Feltételezésünk szerint a SzSzR-válaszra képes, TMV-vel fertőzött dohánylevelekben a mérsékelt szövetkárosodás biológiai „ára” összevethető (kb. azonos) lehet a SzSzR kialakítására képtelen, NahG dohánynövényekben kialakuló, súlyos szövetkárosodás „árával”. A rezisztencia-válaszokhoz szükséges többlet energiaigény a növények egyéb életfolyamatainak súlyos károsodását eredményezheti, aminek következtében korai öregedés (szeneszenencia) illetve növekedésbeni visszamaradás alakulhat ki (Morris *et al.* 2000, Yoshida *et al.* 2002).

6.3. Az antioxidánsok szerepe árpa–lisztharmat kapcsolatok alakulásában

Korábbi megfigyelések az árpa lisztharmat-fertőzést kísérő antioxidáns változásokról leginkább a fogékony és az Mla-rezisztens árpa összehasonlításával születtek (Burhenne és Gregersen 2000, El-Zahaby *et al.* 1995, Kerby és Somerville 1989, Kristensen *et al.* 1999, Vanacker *et al.* 1998). Jelen munkánk újdonsága, hogy kiterjesztettük a vizsgálatokat átmeneti rezisztencia-típusú árpavonalakra is. Kutatásaink az árpa lisztharmattal kompatibilis kapcsolatot kialakító 'Ingrid' árpafajta mellett három, különböző típusú inkompatibilis kapcsolatra irányultak, tehát nem csak az Mla, hanem a kevésbé tanulmányozott Mlg és mlo közel-izogén árpavonalakban is vizsgáltuk a fertőzéssel kapcsolatban kialakuló antioxidáns válaszokat (Harrach *et al.* 2008).

A növények egyik legkorábbi válasza inkompatibilis kórokozók támadására a ROF felhalmozása, mint pl. a szuperoxid ($O_2^{\bullet-}$) és a hidrogén-peroxid (H_2O_2). A lisztharmat-fertőzés hatására specifikus festéssel és mikroszkóppal is kimutatható korai, erős H_2O_2 -felhalmozódás tapasztalható az Mla-, Mlg- and mlo-típusú rezisztens árpában, a fogékony növényekben viszont nem (Hückelhoven *et al.* 1999). A lisztharmat-fertőzést kísérő H_2O_2 -felhalmozódás mennyiségi meghatározása (spektrofluorimetriás módszerrel) volt az egyik célunk a lisztharmat-fogékony 'Ingrid' árpafajtában, valamint annak különféle rezisztencia-géneket hordozó, közel-izogén vonalaiban. Feltettük a kérdést, hogy vajon a sejthalál (HR) hiánya a gazdanövény magasabb antioxidáns kapacitásának a következménye-e. Vizsgálatunk célpontjai voltak ezért a legfontosabb antioxidáns enzimek, valamint az aszkorbát–glutation ciklus nem-enzimatisz antioxidánsai. A membránok károsodását az ion-kiáramlásból eredő vezetőképességi méréssel, az etilén stresszhormon termelődését gázkromatográfiás módszerrel vizsgáltuk.

Az antioxidánsok mennyiségének és aktivitásának megemelkedése csökkenti a növény–kórokozó kölcsönhatásokat kísérő ROF-termelődés káros hatásait. Jelen munkánkkal elsőként igyekeztünk feltárni fontos antioxidánsok aktivitásainak alakulását és ROF-detoxifikációs képességét kompatibilis és három különféle inkompatibilis (Mla, Mlg and mlo) kapcsolatban árpa és árpa lisztharmat között. Eredményeink arra mutatnak, hogy a növényi gazdasejtek antioxidatív védekező-rendszerének serkentése fontos szerepet játszik a kompatibilis biotróf kapcsolat fenntartásában, más szóval a kórokozó virulencia faktorának tekinthető.

A vizsgált antioxidáns enzimek legtöbbje (POX, SOD, APX, GST és GR), kivéve a kataláz és a DHAR enzimeket, hasonló tendenciájú aktivitás-változásokat mutatott a lisztharmat-fertőzés hatására. A fertőzést követő ötödik és hetedik napra a POX, SOD, APX, GST és GR enzimek jelentős mértékben indukálódtak a fogékony árpában a fertőzetlen kontrollhoz képest. A fogékony növényekben mértekhez nagyon hasonló, de kevésbé markáns változásokat tapasztaltunk az enzimaktivitások terén a közel-izogén, Mla-rezisztens árpában. Feltételezhető, hogy ennek oka a nagyfokú hasonlóság a lisztharmat kezdeti fejlődésében (az első 30 órában) a fogékony és az Mla-

típusú rezisztens árpa között. Az Mlg és az mlo vonalakban csak még gyengébben, illetve egyáltalán nem indukálódtak a SOD, GST, APX és GR enzimek a fertőzés hatására.

A POX aktivitás viszont mind a négy vizsgált vonalban erősen emelkedett a fertőzés hatására. Legnagyobb mértékben (a kísérlet végére több, mint ötszörösére) a liztharmat-fertőzött fogékony árpa leveleiben nőtt meg a POX aktivitás, az Mla és Mlg levelekben az ötödik napon mutatott kiemelkedően magas (négyeszeres) aktivitást, míg az mlo árpában a harmadik napon tapasztaltuk a maximumot, azaz a fertőzetlen kontrollban mért aktivitásnak kétszeresét. Kerby és Somerville (1989) megemelt POX aktivitást mért mind a fogékony, mind az Mla-típusú rezisztens árpában 8 és 16 órával a fertőzést követően. Kristensen és munkatársai (1999) is fogékony és Mla árpában mértek poliakril-amid gél-elektroforézissel történő szétválasztás utáni aktivitás-festéssel határozott és folyamatosan emelkedő POX aktivitás-növekedést a *Bgh*-fertőzést követő 1–5 napon keresztül. Újonnan indukált POX izoenzimre nem bukkantak, és nem észleltek különbséget az aktivitás-növekedés ütemében sem a kompatibilis és az inkompatibilis kölcsönhatás között. Ebből arra következtethetünk, hogy nem tekinthető jellemzőnek az izoperoxidázok szerepe a növényi védekezési válaszokban.

A CAT aktivitásban nem mértünk jelentős változást egyik vonalban sem, az egyik mintavételi időpontban sem. Korábban Vanacker és munkatársai (1998) 24 órával a fertőzés után négyeszeres CAT aktivitás-növekedését mutattak ki *Bgh*-fogékony árpában, Mla-rezisztensben pedig nem találtak változást. Későbbi munkájuk során (Vanacker *et al.* 2000) *Bgh*-fertőzést követő 12 és 24 óra közötti időpontok sorát vizsgálva is csak az utolsónál, és ez esetben már csak kétszeres CAT aktivitás-növekedést találtak a fogékony árpában, miközben az Mla-rezisztens árpában is mértek a fertőzés után 16 órával átmeneti CAT indukciót, ami a 24. órára lecsengett. Búzában Renard-Merlier és munkatársai (2007) nem találtak CAT aktivitás-változást 48 órával búza liztharmat (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*) fertőzése után.

A növényi szövetekben nagy mennyiségben előforduló aszkorbinsavnak elsőrendű jelentősége van az antioxidatív folyamatokban mint a legfontosabb redukálószer (Noctor és Foyer 1998). Az APX enzim katalizálja az aszkorbát oxidációját monodehidro-aszkorbát gyökké, ezt pedig a NADPH-függő MDHAR enzim visszaredukálhatja aszkorbáttá, avagy spontán módon is bomolhat aszkorbáttá és dehidro-aszkorbáttá. A dehidro-aszkorbát regenerációja aszkorbáttá a glutation-függő DHAR enzim feladata. Az APX és MDHAR enzimek aktivitásának növekedéséről számolt be Burhenne és Gregersen (2000) a fogékony árpában, de az Mla-típusúban nem, 4 nappal *Bgh*-fertőzés után. Az APX enzim aktivitása a mi kísérleteink kései időpontjaira is megnövekedett a fogékony árpában, ezzel szemben viszont a DHAR enzim aktivitásának csökkenését mutattuk ki a fertőzés hatására. A DHAR aktivitás átmenetileg csökkent a fogékony Ingrid, az Mla és Mlg árpában, a legalacsonyabb aktivitást az első esetben 4 nappal, a két rezisztens vonalban pedig 5

nappal a fertőzés után mutatta. Az mlo árpában a DHAR aktivitás nem változott szignifikánsan. Eredményeink, miszerint a DHAR aktivitás csökkent a fogékony kapcsolatban a negyedik napig, majd ismét növekedni kezdett a kontroll (fertőzetlen) szint irányába, összhangban van El-Zahaby és munkatársainak eredményeivel (1995). Ezen adatok arra engednek következtetni, hogy esetünkben az aszkorbát regenerációja nagyrészt a MDHAR aktivitásának köszönhetően zajlik, mivel ennek aktivitása ellensúlyozhatja a tapasztalt alacsony DHAR aktivitást, így biztosítva az aszkorbinsav „pool” redox egyensúlyát.

Sem az aszkorbinsav-koncentráció, sem a redox állapota nem mutatott különösebb változást a *Bgh*-fertőzés hatására, sem a vizsgált rezisztens vonalakban, sem a fogékony 'Ingrid' árpában a fertőzés kései szakaszában. Vanacker és munkatársai (1998) sem találtak a levelek összes aszkorbát-tartalmában változást 24 órával a fertőzés után, csak a redukált forma aránya nőtt meg enyhén a fogékony árpában, ami az Mla-rezisztens vonalban nem volt megfigyelhető. El-Zahaby és munkatársai (1995) aszkorbinsav-tartalom csökkenést találtak 4–6 nappal a lisztharmat-fertőzést követően a roppant fogékony cv. Emir árpában. Mi azonban csak enyhe, nem szignifikáns aszkorbát-tartalom csökkenést találtunk fogékony 'Ingrid' fajtában 7 nappal a lisztharmat támadása után. Ezekre az eltérő eredményekre magyarázatul szolgálhat az, hogy nem csupán a növények genetikai háttere, hanem a termesztési körülmények, környezeti tényezők is befolyásolhatják az aszkorbinsav-tartalom alakulását.

Vanacker és munkatársai (2000) korábban összefüggést mutattak ki a *Bgh*-rezisztencia és a levélben megemelkedett glutation-tartalom között 18–24 órával a fertőzés után. Kísérleteinkben az összes glutation-tartalom szignifikánsan megnőtt 7 nappal a fertőzés után a fogékony levelekben, míg El-Zahaby és kollégái (1995) már 4 nappal a *Bgh* támadás után ilyen koncentrációbeli növekedést tapasztaltak.

Összegezve elmondhatjuk, hogy az antioxidáns rendszerek aktív védelmével, valamint a citokinin- és auxin-indukció segítségével a biotróf kórokozók a megtámadott növények sejtjeit hosszasan életben tartják, hogy a számukra szükséges hosszú távú, szoros kapcsolat kialakulhasson a kórokozó és a gazdasejt között (Schulze-Lefert és Panstruga 2003). E hormonok feladata fenntartani a szövetek életképességét és kialakítani egy olyan metabolit-raktárat, ami a biotróf kórokozót ellátja a szükséges tápanyagokkal (Jameson 2000).

A *Bgh*-támadásra bekövetkező korai H_2O_2 -felhalmozást árpalevélben már sokan megfigyelték és leírták (Hückelhoven *et al.* 1999, Thordal-Christensen *et al.* 1997, Vanacker *et al.* 2000), míg a hidrogén-peroxid szintek későbbi alakulása a fertőzés során nem került a tanulmányok homlokterébe. A lisztharmat-fertőzés hatására enyhén megemelkedett H_2O_2 -koncentrációt találtunk az Mla, Mlg és mlo árpa leveleiben, ellenben a fogékony árpalevelekben a H_2O_2 -koncentráció szignifikánsan lecsökkent hét nappal a fertőzés után. Korábbi mikroszkópos vizsgálatok kimutatták,

hogy a rezisztens árpavonalak *Bgh*-támadása korai (1–2 nap múltán) H_2O_2 -felhalmozást eredményez (Hückelhoven *et al.* 1999). A H_2O_2 -termelés fokozódása szoros összefüggésben van a növényi védekezéssel a lisztharmat gomba ellen (Hafez és Király 2003, Thordal-Christensen *et al.* 1997). Mitöbb, egyéb kórokozók elleni védekezésben is jelentős szerepe van a hidrogén-peroxidnak (Bradley *et al.* 1992, Levine *et al.* 1994, Olson és Varner 1993). Fogékony árpa növények kezelése külsőleg adagolt ROF-forrásokkal megvédi a növényt lisztharmat- vagy rozsdabetegséget okozó gombáktól azáltal, hogy megöli a kórokozó gombát vagy gátolja annak fejlődését (Hafez és Király 2003, Ouf *et al.* 1993, Wang és Tzeng 1998). Ha azonban a ROF-kal egyidejűleg antioxidánsokkal is kezeljük a növényt, akkor a ROF toxikus hatása a kórokozóra kivédhető (Hafez és Király 2003, Király és El-Zahaby 2000). Király és munkatársai azonban mindezidáig hiába próbálkoztak *Bgh*-fogékonyt indukálni genetikailag rezisztens árpában antioxidáns kezelésekkel (Király Z., személyes közlés). A feltételezést, hogy a H_2O_2 -nak alapvető jelentősége lehet az árpa lisztharmat-rezisztenciájában, tovább erősíti azon eredményünk, miszerint a rezisztens árpával ellentétben a fogékony Ingrid árpalevelekben csökkent a H_2O_2 -tartalom *Bgh*-fertőzést követően.

A H_2O_2 -felhalmozódás és az elektrolit-kiáramlással jellemzett membrán-károsodás között nem találtunk összefüggést. Ez valószínűleg annak köszönhető, hogy a rezisztens vonalakban csak minimális számú sejtet érintett a gombatámadás az egész levélhez képest. Míg az Mla-típusú rezisztencia esetében enyhén megnövekedett az ion-kiáramlás, az Mlg és mlo vonalakban nem volt változás a *Bgh*-támadást követő elektrolit-kiáramlásban. Ezzel ellentétben viszont a fogékony árpában már a fertőzés utáni második napra szignifikáns kiáramlás-növekedés jelentkezett, az ötödik napra pedig a fertőzetlen kontrollhoz képest ez nyolcszorosára növekedett. Felle és munkatársai (2004) korábban ugyanezen árpa-*Bgh* kapcsolatban korai (2 órával a fertőzés után) nem-specifikus, közepes (8–12 óra) papilla-specifikus, és hosszútávú, HR-specifikus lúgosodási folyamatot mutattak ki az apoplastban nem-invázív mikroszonda segítségével.

Az etilén-termelés hasonló tendenciát mutatott, mint az ion-kiáramlás a *Bgh*-fertőzött árpalevelekben. Ebben az esetben is valószínűleg a nekrotizáció által csak kis számban érintett sejtek miatt az Mlg és az mlo növényekben nem mértünk etilén-termelésbeni változást a fertőzés hatására, és az Mla növényekben is csak kismértékű növekedést tapasztaltunk még a 4. napon is. Ellenben a fogékony, fertőzött növényekben már 3 nap után látványos, drasztikusan megemelkedett etilén-termelés volt megfigyelhető. Eme adatokkal megegyezik búzán végzett kísérletek eredménye Fauth és Hoffmann tollából (1992), akik búza lisztharmattal fertőztek különböző kvantitatív rezisztenciával bíró búzafajtákat, és úgy találták, hogy 5–9 nap múlva az etilén-termelés mértéke összefüggésben van a *B. graminis* f. sp. *tritici*-vel fertőzött leveleken megszámlálható pusztulák mennyiségével.

Figyelemreméltó eredmény még a fertőzetlen mlo árpában mért POX aktivitás és ion-kiáramlás fokozott mértéke, ami szignifikánsan nagyobb volt a vad típusú *Mlo* gént hordozó másik három árpavonalban mérthez képest, megerősítvén korábbi megfigyeléseket miszerint az *Mlo* gén mutációja korai szenescenciát indukál árpalevelekben (Piffanelli *et al.* 2002, Schulze-Lefert és Panstruga 2003).

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy a *Bgh*-fertőzés eredményképpen az antioxidatív védekező-rendszer jelentős mértékben indukálódott a fogékony árpában. Feltételezhető, hogy az antioxidánsok szintjének eme megemelkedése megelőzheti a ROF-felhalmozódást a *Bgh* által megtámadott fogékony növényekben. Ezzel összecseng eredményünk, miszerint valóban alacsonyabb H₂O₂-szintet mértünk a fertőzött fogékony árpában, mint a rezisztens kapcsolatokban. Megfigyeléseink alapján nem kizárható az elképzelés, hogy a lisztharmat gomba maga felelős antioxidáns vegyületek vagy enzimek termeléséért, amivel védekezhet a növény által termelt ROF ellen. Ezt az elképzelést Zhang és munkatársai (2004) korábbi munkája is alátámasztja, aminek során kimutatták, hogy a *Bgh* extracelluláris katalázt választ ki a hausztóriumaiából az árpa megfertőzése során. Munkánk során nem találtunk magasabb CAT aktivitást a *Bgh*-fertőzött fogékony árpában, viszont az enzim aktivitását teljes levél-homogenátumban mértük, nem lokálisan, a gazda és a parazita találkozási pontjánál. Így nyitott kérdés marad, hogy a *Bgh*-fertőzött fogékony árpában megfigyelhető megemelkedett antioxidáns szintekért vajon nagyobb részben a növényi sejtek vagy a gomba felelős-e.

6.4. Szimbiózis szerepe sóstressz leküzdésében

A termesztett árpa viszonylag sótoleráns kultúrnövénynek számít, de meglehetősen nagy variabilitás figyelhető meg e tekintetben az árpafajták között (Epstein *et al.* 1980). Két különböző genotípust, a sótoleráns 'California Mariout' és a sóérzékeny 'Ingrid' árpafajtákat választottuk ki a kísérletekhez, hogy megállapítsuk ezek sókezelésre adott metabolikus válaszait.

Nemrég mutatták ki egy gyökér endofita bazídiumos gomba, a *Piriformospora indica* esetében, hogy képes fokozni az árpa ellenálló-képességét gyökér- és levélbetegségek ellen, valamint csökkenti a közepes erősségű (100 mM NaCl) sóstressz károsító hatását (Waller *et al.* 2005). Jelen munkánkban azt találtuk, hogy a *P. indica* megvédi az árpát még erős sóstressztől is (300 mM NaCl), továbbá vállalkoztunk a *P. indica*-kiváltotta sótolerancia háttérében álló metabolikus változások vizsgálatára a sóstressz fontos indikátorainak (metabolikus hőtermelés, lipid-peroxidáció és zsírsav-összetétel) mérésével.

A *Piriformospora indica*-t a radzsasztáni Thar sivatagban (India) izolálták *Prosopis juliflora* és *Zizyphus nummularia* rizoszférájából (Verma *et al.* 1998). A gomba a növények gyökereit kolonizálja és serkenti mind egyszikű, mint kétszikű gazdanövények hajtásnövekedését (Varma *et*

al. 1999). Az arbuszkuláris mikorrhiza gombákkal ellentétben, a *P. indica* könnyedén növeszthető szintetikus táptalajon, ami lehetővé teszi nagy mennyiségben való felszaporítását és a növénytermesztésben történő lehetséges felhasználását.

Korábbi kutatások csökkent metabolikus aktivitást és légzési rátát mutattak ki sóérzékeny árpában sókezelés után, míg ezek a paraméterek változatlanok maradtak sókezelt sótoleráns növényekben (Criddle *et al.* 1989, Jolivet *et al.* 1990). Így a hőkibocsátás kalorimetrikus meghatározása hasznos eszköz lehet a növények sótoleranciájának jellemzésére (Criddle *et al.* 1989, Schabes és Sigstad 2004).

A lipid-peroxidáció a sóstressz okozta sejtmembrán károsodással függ össze (Fadzilla *et al.* 1997). NaCl-kezelés magasabb arányú lipid-peroxidációt okozott a sóérzékeny növényekben, mint a sótoleráns kultúrnövényekben (Hernández *et al.* 1995, Yang *et al.* 2004). Ezek a megfigyelések azt sugallják, hogy a lipid-peroxidációs ráta is használható annak jellemzésére, hogy milyen hatékonysággal képesek a *P. indica*-kezelt növények ellenállni a sóstressznek.

A zsírsav-telítetlenség is összefügg a növényi sóstresszrel (Elkahoui *et al.* 2004, Liang *et al.* 2005). Korábban Berberich és munkatársai (1998) úgy találták, hogy ω -3 deszaturáz gének indukálódnak kukoricában magas só-koncentráció hatására. Ezen eredményekkel megegyezően kimutatták, hogy a linolénsav kiemelkedő szerepet játszik a dohánynövények sóstressz elleni ellenállóságában (Im *et al.* 2002). Ezért a nem-kolonizált és *P. indica*-kolonizált árpa leveleinek zsírsav-összetételét vizsgáltuk sóstressz hatására, hogy jellemezzük a zsírsav-telítetlenséget.

Egyre több bizonyíték látszik arra mutatni, hogy a magas só-koncentráció oxidatív stresszt vált ki a növényekben, ami legalább részben felelős a szövetkárosodásért (Hernández *et al.* 2000, Mittova *et al.* 2004). Több kísérlet is kimutatta, hogy a magas sótartalom a sóérzékeny növényeknél tapasztalt szint fölé növeli a sótoleráns növények antioxidáns aktivitását (Gossett *et al.* 1994, Gueta-Dahan *et al.* 1997, Mittova *et al.* 2004).

Jelen munkánkban világos bizonyítékot mutatunk arra, hogy *P. indica*-kolonizált sóérzékeny cv. Ingrid árpánál a só-indukálta válasz – a hőkibocsátás mértéke és az etán termelés alapján – a sótoleráns növényekben találtakra emlékeztet. Kalorimetriás méréseink arra utaltak, hogy sókezelés után a metabolikus aktivitás mértéke növekedett a *P. indica*-kolonizált növényekben. Ezek szerint az endofitával való szimbiózis túlkompenzálja a levél metabolikus aktivitásának só-indukálta gátlását. Korábbi eredmények szerint vad zab biotípus természetes herbicid-rezisztenciájának mértéke szoros összefüggést mutat a herbicid-kezelés kiváltotta hőtermelés mértékével a védekezési válaszhoz szükséges metabolikus folyamatok aktiválódása következtében (Stoklosa *et al.* 2006). Ez arra utal, hogy a fokozott sóstressz-tolerancia összefügghet a *P. indica*-kolonizált árpa intenzívebb metabolikus aktivitásával.

Korábbi tanulmányok kimutatták, hogy külsőleg alkalmazott telítetlen zsírsavak meg tudják védeni az árpat NaCl-indukálta stressz során (Zhao és Qin 2005). Ezért a zsírsavak telítetlensége fontos tényezője lehet a sóstresszre kialakuló növényi toleranciának. A *P. indica*-kolonizáció az árpa leveleiben található olajsav mennyiségének szignifikáns csökkenéséhez vezet, miként azt sókezelt árpa gyökérben is kimutatták (Liang *et al.* 2005, Zhang *et al.* 2002). A sókezeléshez hasonlóan a *P. indica* is kissé növelte a C18:3 zsírsav arányát az árpa levelekből izolált foszfolipid-frakcióban. Egy kivétellel (C16:1), a *P. indica* által kiváltott változások a zsírsav-összetételben hasonlóak voltak a só okozta változásokhoz. A gazdanövény zsírsav-összetételére való illetlen hatás a szimbiotikus adaptív stratégia része lehet, melyet az endofita irányít, hogy gazdanövényével együtt valahogy elviseljék a sóstresszt a kedvezőtlen környezetben (Rodriguez *et al.* 2008). Feltételezzük, hogy a *P. indica* hasonló hatást válthat ki a gazdanövény zsírsav összetételében az eredeti környezetében, a száraz Thar sivatagban is.

A só kiváltotta lipid-peroxidáció szignifikánsan csökkent a *P. indica*-kezelt növényekben. A sejtmembrán-károsodás mint a sóstressz következménye, összefüggésben van a ROF felhalmozódásával (Hernández *et al.* 1995), ami toxikus lehet az élő sejtekre és oxidatív károsodást okozhat a nukleinsavakban, zsírokban és fehérjékben. Másrészt, a ROF szignál-molekulaként is működhetnek stressz-válaszokban (Apel és Hirt 2004). Egy friss közlemény szerint a széles gazdaspektrummal jellemezhető endofita gombák hatékony toleranciát biztosíthatnak gazdanövényeiknek a ROF ellen abiotikus stressz körülmények között, mint amilyen például a magas só-koncentráció a növény környezetében (Rodriguez *et al.* 2008). Érdekes, hogy a szűk gazdaspektrummal rendelkező *Epichloë festucae* endofita gomba képes NADPH-oxidáz enzimmel szuperoxid előállítására, hogy szimbiotikus kapcsolatot hozzon létre *Lolium perenne*-vel (Tanaka *et al.* 2006). *P. indica*-kolonizált árpa gyökérben nem tudtunk H₂O₂-felhalmozódást kimutatni sem a behatolás helyén, sem a gyarmatosított sejtekben.

Az ROF mennyisége és az antioxidáns védelem közötti finom egyensúly felborulása sejtkárosodásban nyilvánul meg (Foyer és Noctor 2000). Korábban kimutatták azonban, hogy a *P. indica* antioxidánsokat indukál árpa gazdanövényben: az aszkorbinsav mennyisége, a redukált aszkorbát aránya az oxidált aszkorbáthoz képest, és a DHAR aktivitása megemelkedett a gyökerekben (Waller *et al.* 2005). Mivel nem találtunk aszkorbátot a *P. indica*-ban, feltételezhető, hogy a gomba indukálja az aszkorbát felhalmozódását a növényi gyökérsejtekben. Az aszkorbinsav kulcsfontosságú szubsztrátként funkcionál az aszkorbát–glutathion ciklusban, a hidrogén-peroxid méregtelenítése érdekében. Ezenkívül, közvetlenül is hatékony a ROF közömbösítésében (Foyer és Noctor 2000). A *P. indica*-kolonizált 'Ingrid' növények nagyfokú (300 mM) NaCl-stressz alatt is hatékonyan tartották fenn az aszkorbinsav „pool” redox egyensúlyát, valamint a sókezeletlen kontrollnál magasabb összes aszkorbát-tartalmat. Meg kell hagyni azonban, hogy az idő

előrehaladtával az aszkorbát mennyisége csökkent a sókezelt, kolonizált gyökerekben is (Baltruschat *et al.* 2008). Meglepő módon, az aszkorbát mennyisége és a redukált aszkorbát aránya az oxidálthoz képest drámai módon csökkent a sókezelt, nem gyarmatosított gyökerekben az egy hetes sókezelés után röviddel. Ezen eredmények egybevágnak a Mittova és munkatársai (2004) által bemutatottakkal, akik azt találták, hogy az AA/DHA ráta csökkent a sóérzékeny *Lycopersicon esculentum*-ban sóstressz hatására, a sótűrő *Lycopersicon pennellii*-ben viszont növekedett. Mások kimutatták, hogy az aszkorbát mennyiség csökkent mind a sóérzékeny, mind pedig a sótoleráns borsó fajtákban, de a csökkenés fokozottabban mutatkozott a NaCl-érzékeny növényekben (Hernández *et al.* 2000). Az aszkorbát fontosságát a sóstressz hatása alatti sejtvédelemben kimutatták aszkorbát-hiányos *Arabidopsis* mutánsban is. Az aszkorbát–glutation ciklus gátolt működése nyomán nagy mennyiségű ROF halmozódott föl eme növényekben, és sóstresszel szemben fokozott érzékenységet mutattak (Huang *et al.* 2005). Ezzel megegyezően, külsőleg adagolt aszkorbát növelte a sóstressz-tűrő képességet és enyhítette a só kiváltotta oxidatív sérüléseket (Shalata és Neumann 2001). A másik lehetőség az, hogy az aszkorbát a gyökérnövekedéssel kapcsolatos folyamatokon keresztül növeli az árpa ellenálló-képességét a magas sótartalommal szemben. Aszkorbinsav, illetve az aszkorbát „pool” kedvezően nagyfokú redukáltsága serkenti a gyökerek hosszanti növekedését, valamint növeli a gyökértömeget (Córdoba-Pedregosa *et al.* 2005).

Korábbi vizsgálatok arra utalnak, hogy a növények sóstresszel szembeni ellenálló-képessége összefüggésben áll az antioxidáns enzimek indukciójával (Bor *et al.* 2003, Hernández *et al.* 2000, Sekmen *et al.* 2007). Mi is azt találtuk, hogy a NaCl növelte a CAT, APX, DHAR, MDHAR és GR aktivitását a sóstressz alatt levő árpa gyökerében (Baltruschat *et al.* 2008). Habár az enzimaktivitások csökkentek mind a sóérzékeny, mind pedig a sótoleráns növényekben a kezdeti indukció után, a csökkenés kisebb mértékben és késleltetve jelentkezett a *P. indica*-kolonizált 'Ingrid' árpában és a sótoleráns cv. California Mariout-ban. Adataink rávilágítanak ezen enzimek fontosságára az árpa sótűrésében. Az MDHAR aktivitás mind a sóérzékeny, mind pedig a sótoleráns árpa gyökerében megemelkedett szinten maradt egészen 4 hétig magas só-koncentráció (300 mM NaCl) esetében. A CAT és APX enzimek folytonos aktivitás-növekedést mutattak a *P. indica*-kolonizált 'Ingrid' árpában hosszú távú sós kezelés után. Ezzel szemben, a nem kolonizált 'Ingrid' árpában csökkent az aktivitásuk 4 hétig tartó sókezelés után. Ezen adatokkal megegyezően, a CAT, APX vagy DHAR enzimek túltermelése transzgenikus növényekben növelte a sóstresszel szembeni ellenálló-képességet (Badawi *et al.* 2004, Nagamiya *et al.* 2007, Ushimaru *et al.* 2006). Meglepő módon, olyan kettős mutáns *Arabidopsis* növény, amely mind citoszólikus-, mind tilakoid APX-hiányos, szintén fokozott ellenálló-képességet mutatott a sóval szemben. Ez arra utal, hogy a

ROF, mint például a H_2O_2 , felelősek lehetnek egy abiotikus stressz-szignál aktiválásáért, ami fokozott stressztűrő-képességhez vezethet (Miller *et al.* 2007).

Egyelőre nem ismert a pontos mechanizmus, amin keresztül a *P. indica* fokozni tudja a növények antioxidatív védekezőképességét. Nemrégiben kimutatták, hogy a *P. indica* képes auxint termelni a növények gyökereiben (Sirrenberg *et al.* 2007). Külsőleg alkalmazott auxinról kimutatták, hogy ideiglenesen növeli a ROF koncentrációját, majd megelőzi a H_2O_2 -kibocsátást a paraquat okozta oxidatív stresszre adott válaszként, tovább fokozza az APX aktivitást, miközben csökkenti a CAT aktivitást (Joo *et al.* 2001, Pasternak *et al.* 2007). Másrészt, a *P. indica* növelte a methionin-szintetáz mennyiségét, ami meghatározó szerepet játszik a poliamin- és etilén-bioszintézisben (Peškan-Berghöfer *et al.* 2004). A poliaminokat túltermelő transzgenikus dohánynövényeknek fokozott sóstressz-ellenálló képessége is van, és a sókezelés nagyobb mértékben váltja ki az antioxidáns enzimek, mint pl. APX, SOD vagy GST aktivitását ezekben a növényekben, mint a vad típusú kontrollban (Wi *et al.* 2006). A *P. indica* egyik közeli endofita rokona, a *Sebacina vermifera*, csökkenti *Nicotiana attenuata*-ban az etilén-termelését (Barazani *et al.* 2007). Érdekes, hogy előzetes eredményeink arra utalnak, hogy a *P. indica* etilén-bioszintézist indít be az árpa gyökereiben. Az etilénre mint jelátviteli elemre szükség lehet a növény sóval szembeni ellenálló-képességének kialakulásához (Cao *et al.* 2006), valamint az etilén antioxidáns enzimek termelését válthatja ki, ha a növények hőstressznek vannak kitéve (Larkindale és Huang 2004). További kísérletek szükségesek azonban a fitohormonok szerepének tisztázására a *P. indica* által árpában kiváltott sótűrés tekintetében.

Végső megállapításként, eredményeink megmutatták, hogy a magas só-koncentrációjú (300mM NaCl) környezetet sóérzékeny árpa is elviseli, ha előzőleg szimbiózist hoz létre a bazídiumos *P. indica* gombával. Az endofita által kialakított sóstressz-tűrő képesség úgy tűnik, hogy legalább is részben, az aszkorbinsav és az antioxidáns enzimek indukálásának köszönhető. Megfigyeléseink ugyan csak összefüggéseket mutatnak, nem okokat, de alátámasztja ezeket az a tény is, hogy a genetikailag sótűrő cv. California Mariout árpában is megemelkedett antioxidáns aktivitást lehetett kimutatni sós környezetben. Ugyanakkor, többféle szimbiotikus mechanizmus is felelős lehet a sótűrésért. Például a gyökér endofiták hathatnak biológiai közvetítőként úgy, hogy a szimbiózisban élő növényekben gyorsabb és erősebb a stressz-válasz rendszer aktiválódása, mint nem kolonizált növényekben (Rodriguez *et al.* 2004). Mivel a *P. indica* széles gazdaspektrummal rendelkezik és növényen kívül, mesterséges tenyészetben is könnyen szaporítható tömegesen, felhívjuk a figyelmet lehetséges felhasználhatóságára a termesztett növények sóstressz elleni védelmében sivatagos és félszáraz mezőgazdasági régiókban.

6.5. Hősokkal előidézett lisztharmat-fogékonyágban indukálódó jelátviteli gének

Egy előzetes stressz, mint pl. hőkezelés, hatására kialakulhat rezisztencia árpában lisztharmat-fertőzéssel szemben (Schweizer *et al.* 1995, Vallélian-Bindschedler *et al.* 1998). E kutatócsoport munkatársai arra a következtetésre jutottak, hogy a hősokk hatására indukálódó folyamatok rezisztenciát eredményeznek a fogékony árpában. Nagyon fontos azonban megjegyezni, hogy a hősokk pontos hőmérséklete illetve időtartama nagymértékben befolyásolja a kiváltott hatást. A mi kísérleteinkben alkalmazott hőmérséklettel és időtartammal, valamint a hősokk és a fertőzés között eltelt idővel éppen ellentétes eredményt tudtunk elérni: azaz eme körülmények között a rezisztens Mla, Mlg és mlo árpavonalak fogékonná váltak lisztharmat-fertőzésre (Barna *et al.* 2003b).

Érdekes eredményre jutottak Janda és munkatársai (2008), akik azt vizsgálták, hogy a *Drechslera tritici-repentis* (teleomorf alakja: *Pyrenophora tritici-repentis*) nekrotróf kórokozó gombára eltérő fogékonyággal rendelkező búza genotípusok érzékenységét hogyan befolyásolja növekvő koncentrációjú polietilén-glikol (PEG-6000) jelenléte Hoagland-tápoldatban. A PEG-kezelés szárazságstresszhez hasonló ozmotikus stresszt jelent a növények számára. A *D. tritici-repentis*-szel való fertőzést 6 órával megelőző, és a kórfolyamat kialakulása során is folyamatosan fenntartott enyhébb mértékű ozmotikus stressz (a tápoldatban 5% PEG) a fogékony genotípusban a kezeletlen növényekhez képest kissé visszaszorította a gombatünetek kifejlődését. A rezisztens genotípus esetében pedig a legmagasabb (20%-os) PEG-koncentráció idézett elő szignifikáns változást, ami az ellenállóság bizonyos fokú visszaszorulásában (tehát fogékonyág növekedésben) nyilvánult meg. Ez nagyon szép példa arra, hogy azonos eredetű, de különböző mértékű stresszel fogékony növényekben bizonyos fokú rezisztenciát, míg rezisztens növényekben fogékonyágot lehet indukálni.

Jelen munkánkban RT-PCR módszerrel a hősokk és/vagy lisztharmat-fertőzés hatására bekövetkező génkifejeződési válaszok vizsgálatát kezdtük meg a hősokkal fogékonná tett, de eredetileg lisztharmatra széles körű, nem rassz-specifikus rezisztenciával rendelkező mlo árpában. Az első vizsgált gén, a Hsp70 hősokk-fehérje génjének transzkripciója – nem meglepő módon – már 24 órával a hőkezelés után indukciót mutatott. A Hsp70 hősokk-fehérje génjének átíródása additív módon indukálódott a két kezelés hatására.

Hasonlóképpen alakult a BI-1 (Bax Inhibitor-1, egy programozott sejthalált gátló fehérje) génjének kifejeződése is, tehát mind a hősokk, mind a lisztharmat-fertőzés indukálta azt. Hückelhoven és munkatársai (2003) a *BI-1* gén kifejeződésének indukcióját eltérőnek találták fogékony és rezisztens árpában lisztharmat-fertőzést követően, valamint eredményeinket megerősítendő az idő múlásával egyre fokozottabb *BI-1* kifejeződést detektáltak. Eredményeik is

támogatják elképzelésünket, miszerint a jövőben a többi közel-izogén árpavonalat is (Ingrid, Mla, Mlg) érdemes lesz vizsgálatainkba bevonni.

Tanulmányoztuk továbbá két WRKY fehérje génjének kifejeződését, amikről ismert, hogy a növények kórokozók elleni védekezésében és stressz-válaszaiban szerepet játszó transzkripciós faktorok (Eulgem *et al.* 2000). Azt találtuk, hogy a *WRKY1* gén kifejeződését a fertőzés gyengébben, a hőkezelés erősebben indukálta, az együttes hatás viszont gyengébb indukciót eredményezett, mint csak a hőkezelés, azaz a fertőzés csökkentette a hőkezelés hatását. A *WRKY2* gén pedig csak a fertőzés hatására indukálódott, és érdekes módon a két kezelés együttes hatása gyengébb volt, mint a fertőzésé egyedül, azaz itt meg a hőkezelés csökkentette a fertőzés hatását.

Összefoglalva, eddigi eredményeink a soron következő kutatási feladatom előkísérleteinek tekinthetők, de mindenképpen érdekes és biztató irányvonalat jelölnek ki a közeljövőre nézve. Egy nemrég megjelent dolgozatban Shen és munkatársai (2007) izgalmas összefüggést fedeztek föl az Mla-típusú rassz-specifikus rezisztencia és a növények alap- vagy általános rezisztenciája között, amelyek jelátviteli útjai pont az általunk is vizsgált *WRKY* transzkripciós faktorok révén kapcsolódnak, így vizsgálataink következő jelöltje nem is lehet kérdéses.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A különféle abiotikus és biotikus stresszorok oxidatív stresszt okoznak a növényekben reaktív oxigénformák (ROF) képződésén keresztül, amiket enzimatikus és nem enzimatikus antioxidánsok segítségével semlegesítenek a növények. Munkánk célja a növények antioxidáns kapacitása és a környezetükből őket érő stresszekkel szemben tanúsított ellenálló-képessége közötti összefüggés tanulmányozása volt.

Abiotikus stresszel kapcsolatos vizsgálatainkban azt találtuk, hogy az öregebb levelekhez képest a fiatalabb 'Samsun' dohánylevelek a membránkárosodás mértékével jellemezve toleránsabbnak mutatkoznak mind toxikus nehézfém-sók (higany-klorid) által, mind közvetlenül ROF (hidrogén-peroxid) által okozott oxidatív károsodással szemben csakúgy, mint a juvenilitásukat hosszan megőrizni képes, citokinin-túltermelő transzgenikus CTKm dohánynövények. Ezzel párhuzamosan a nagyobb antioxidáns kapacitásra utaló magasabb kataláz és szuperoxid-dizmutáz enzimaktivitást mértünk a fiatalabb levelekben.

A 'Xanthi-nc' dohányfajta rezisztenciája a dohány mozaik vírussal (*Tobacco mosaic virus*, TMV) szemben lokalizált, nekrotikus léziók formájában megnyilvánuló túlérzékenységi válasszal jár. A TMV-fertőzött Xanthi növényekben szisztémikus szerzett rezisztencia (SzSzR) alakul ki, míg a szalicilsav-hiányos transzgenikus NahG dohánynövényekben nem tud SzSzR kialakulni egy második TMV-fertőzéssel szemben. Jelen munkánkban összehasonlító elemzésnek vetettük alá a vad típusú Xanthi és a transzgenikus NahG dohányban a TMV-indukálta sejtelhalást kísérő változásokat a metabolikus aktivitás, a lipid-peroxidációt jellemző etán-kibocsátás és a zsírsav-összetétel alakulásának alapján. A metabolikus hő-kibocsátás és az etán-termelődés a fertőzetlen NahG levelekből messze alulmaradt a Xanthi dohányban mértekhez képest. TMV-fertőzést követően azonban ezek az értékek hasonlóan magas szintekre emelkedtek mind SzSzR-t mutató, mind előfertőzést nem kapott Xanthi, mind pedig a NahG növényekben. A TMV-fertőzés hatására növekedett a NahG dohányban a zsírsav-telítettség, de a membrán-fluiditást ez nem befolyásolta. Feltételezésünk szerint a SzSzR megléte azért nem befolyásolta a TMV-indukálta lipid-peroxidációt és metabolikus aktivitást, mert az SzSzR során felhalmozódó szalicilsav maga is hasonló változásokat eredményez e mutatókban.

Lisztharmat-fogékony 'Ingrid' árpafajta, valamint *Mla*, *Mlg* (mindkettő HR-rel kísért specifikus rezisztenciát kódoló) vagy *mlo* (nem-specifikus rezisztenciát kódoló) rezisztenciagént hordozó, közel-izogén árpavonalakban mértük az aszkorbát- és glutation-tartalmat, valamint antioxidáns enzimek alakulását. A lisztharmat-fertőzés után a fogékony vonalban megemelkedett a vizsgált antioxidánsok legtöbbjének szintje, miközben a rezisztens vonalakban a hidrogén-peroxid felhalmozódása volt megfigyelhető. Eredményeink alátámasztják a kórokozó által indukált

fogékonyság elméletét, azaz azt a feltevést, hogy a lisztharmat-gomba az árpával kialakított kompatibilis kapcsolat esetében indukálja a növény antioxidánsait annak érdekében, hogy elkerülje az ellene képződött reaktív oxigénformák károsító hatását.

A *Piriformospora indica* gyökér endofita bazídiumos gomba, növényi zöldtömeg-növelő hatásán kívül, ellenálló-képességet indukál árpában gyökér- és levél-betegségekkel szemben, valamint csökkenti a sóstressz okozta károkat. A *P. indica* által kialakított sótűrés biokémiai hátterét vizsgáltuk árpában olyan élettani stressz-jelzőkkel mint a metabolikus aktivitás, a zsírsav-összetétel és a lipid-peroxidáció mértéke. A gyökerek előzetes *P. indica*-kolonizációja kiküszöbölte a NaCl-stressz során megfigyelhető növekedésbeli visszamaradást, illetve fokozott lipid-peroxidációt, metabolikus hőkibocsátást és zsírsav-deszaturációt sóérzékeny 'Ingrid' árpafajta leveleiben. A szimbiózis továbbá serkenti a sóérzékeny árpa gyökereiben az antioxidatív védekező-rendszert sóstressz során és ez az antioxidáns indukció sőtűrő árpában is megfigyelhető a *P. indica*-kolonizációtól függetlenül, ami arra utal, hogy az antioxidánsok alakulásának fontos szerepe lehet mind az öröklött, mind a szimbiózisban indukált sőtűrésben.

A széleskörű, teljes rezisztenciával bíró mlo-típusú árpában hősokk-kezeléssel lisztharmat-fogékonytságot indukáltunk, majd vizsgáltuk egyes abiotikus és biotikus stressz-válaszban szerepet játszó gének (*BI-1*, *HSP70*, *WRKY1*, *WRKY2*) kifejeződését RT-PCR-módszerrel. Előzetes eredményeink szerint a HSP70 hősokk-fehérjét kódoló gén és a *BI-1* gén (Bax inhibitor 1, egy programozott sejthalált gátló fehérje) átíródása additív módon indukálódott a hősokk és a lisztharmat-fertőzés hatására. A WRKY1 és WRKY2 transzkripciós faktorok génjeinek átíródása viszont eltérően reagált a két kezelés külön-külön, illetve együttes hatására, ami további érdekes kérdéseket vet fel az abiotikus és biotikus stressz során aktiválódó jelátviteli utak kapcsolódásáról. A jövőben e vizsgálatok kiterjesztését tervezzük mind az Mla- és Mlg-típusú rezisztens árpavonalakra, mind pedig a fogékony 'Ingrid' árpára.

8. SUMMARY

Different abiotic and biotic stressors cause oxidative stress in plants through the formation of reactive oxygen species (ROS), which are neutralized by the plants via enzymatic and non-enzymatic antioxidants. The aim of our work was to investigate the correlation between the antioxidant capacity of plants and their ability to tolerate various stresses from their environment.

In our studies concerning abiotic stress, we found that compared to older leaves, younger ‘Samsun’ tobacco leaves exhibit increased tolerance (detected by the extent of membrane damage) in response to oxidative damage caused either by toxic heavy metal salts (mercuric chloride) or directly by ROS (hydrogen peroxide), similarly to cytokinin-overproducing transgenic CTKm tobacco plants that are able to preserve their juvenility for long term. Concomitantly, higher catalase and superoxide dismutase enzyme activities were measured, revealing the enhanced antioxidant capacity of the younger leaves.

‘Xanthi-nc’ tobacco plants are resistant against *Tobacco mosaic virus* (TMV) developing a hypersensitive response (HR) in the form of local necrotic lesions. TMV-inoculated Xanthi plants develop systemic acquired resistance (SAR), while salicylic acid-deficient transgenic NahG tobacco plants are not able to establish SAR against a second inoculation by TMV. Here we report the comparative analysis of changes in metabolic activity, ethane emission characterising lipid peroxidation and lipid composition in wild-type Xanthi-nc and NahG tobacco plants during TMV-induced cell death. Heat efflux and ethane emission from uninoculated leaves of NahG plants were found to be significantly lower than from Xanthi tobacco. However, these values increased up to similar levels in TMV-inoculated Xanthi plants with or without SAR and in NahG plants. TMV-inoculated leaves of NahG tobacco showed higher fatty acid saturation, but membrane fluidity was not altered. We hypothesise that induction of SAR had no effect on TMV-induced lipid peroxidation and metabolic activity because salicylic acid accumulated in SAR, itself can induce similar changes in these stress indicators.

We measured the changes in the levels of ascorbate, glutathione and antioxidant enzymes in cv. Ingrid barely, susceptible to powdery mildew, as well as in resistant near-isogenic barely lines with *Mla*, *Mlg* (both of them encoding specific resistance accompanied by HR) or *mlo* (encoding non-specific resistance) resistance genes. In susceptible cv. Ingrid the majority of the examined antioxidants was enhanced after infection with powdery mildew, whereas in the resistant lines the level of hydrogen peroxide increased considerably. Thus our results support the theory of pathogen-induced susceptibility, i.e. the hypothesis that the powdery mildew fungus, in a compatible relationship with barely, may induce antioxidants in the plant in order to avoid the damaging effect of ROS produced by the plant against the invading pathogen.

Besides promoting the biomass of its host, the root endophytic basidiomycete *Piriformospora indica* has been shown to induce resistance against root and leaf pathogens, and tolerance to damage caused by salt stress in barley. Biochemical mechanisms underlying *P. indica*-mediated salt tolerance were studied in barley by monitoring physiological markers for salt stress such as metabolic activity, fatty acid composition and rate of lipid peroxidation. Root colonization by *P. indica* compensated for the NaCl-induced biomass-reduction and attenuated the elevated lipid peroxidation, metabolic heat efflux and fatty acid desaturation in leaves of the salt-sensitive barley cultivar Ingrid. The endophyte also enhances the antioxidant system in barley roots under salt stress conditions and since this up-regulation is characteristic of NaCl-treated roots of a salt-tolerant barley cultivar, irrespective of plant colonization by *P. indica*, these findings suggest that antioxidants might play a role in both inherited and endophyte-mediated plant tolerance to salinity.

Heat shock was utilised to induce susceptibility in mlo barley with horizontal powdery mildew resistance, then changes in the expression levels of several genes known to play a role in abiotic or biotic stress responses (*BI-1*, *HSP70*, *WRKY1*, *WRKY2*) were studied by RT-PCR-technique. Our preliminary findings suggest that expression of the gene encoding the heat shock protein HSP70 and of the *BI-1* gene (BAX inhibitor 1, a programmed cell death inhibitor) was induced in an additive manner by heat shock treatment and powdery mildew inoculation. The expression of genes encoding transcription factors WRKY1 and WRKY2 was, on the other hand, altered in different ways by the two treatments separately or combined, which gives rise to further interesting questions concerning the interconnections between abiotic and biotic stress signal transduction pathways. In the future, we plan to extend these investigations to the Mla and Mlg resistant barley lines and to the susceptible cv. Ingrid as well.

- ÁDÁM A. L., BESTWICK C. S., BARNA B., MANSFIELD J. W. (1995): Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Planta* 196: 240–249.
- ÁDÁM A. L., DUBERT F., GILLY A., BARNA B., SKOCZOWSKI A. (1993): Measurement of exothermic heat-flow and leaf temperature of TMV-infected and CMV-infected plants by microcalorimetry and infrared detection technique. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 28: 195–200.
- ÁDÁM A. L., GALAL A. A., MANNINGER K., BARNA B. (2000): Inhibition of the development of leaf rust (*Puccinia recondita*) by treatment of wheat with allopurinol and production of a hypersensitive-like reaction in a compatible host. *Plant Pathology* 49: 317–323.
- ÁDÁM A., BARNA B., FARKAS T., KIRÁLY Z. (1990): Effect of TMV induced systemic acquired-resistance and removal of the terminal bud on membrane-lipids of tobacco-leaves. *Plant Science* 66: 173–179.
- AEBI H. (1984): Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology* 105: 121–126.
- ALFENITO M. R., SOUER E., GOODMAN C. D., BUELL R., MOL J., KOES R., WALBOT V. (1998): Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione S-transferases. *The Plant Cell* 10: 1135–1149.
- ALLAN A. C., FLUHR R. (1997): Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *The Plant Cell* 9: 1559–1572.
- ALLEN R. D., WEBB R. P., SCHAKE S. A. (1997): Use of transgenic plants to study antioxidant defenses. *Free Radical Biology and Medicine* 23: 473–479.
- ALSCHER R. G., DONAHUE J. L., CRAMER C. L. (1997): Reactive oxygen species and antioxidants: Relationships in green cells. *Physiologia Plantarum* 100: 224–233.
- ALVAREZ M. E. (2000): Salicylic acid in the machinery of hypersensitive cell death and disease resistance. *Plant Molecular Biology* 44: 429–442.
- ALVAREZ M. E., PENNELL R. I., MEIJER P. J., ISHIKAWA. A., DIXON R. A., LAMB C. (1998): Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. *Cell* 92: 773–784.

- ANDERSON M. D., CHEN Z. X., KLESSIG D. F. (1998): Possible involvement of lipid peroxidation in salicylic acid-mediated induction of PR-1 gene expression. *Phytochemistry* 47: 555–566.
- APEL K., HIRT H. (2004): Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 55: 373–399.
- ASADA K. (1992): Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiologia Plantarum* 85: 235–241.
- ASADA K. (1999): The water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygen and dissipation of excess photons. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50: 601–639.
- ASADA K., TAKAHASHI M. (1987): Production and scavenging of active oxygen in photosynthesis. 227–287. p. In: KYLE D. J., OSMOND C. B., ARNTZEN C. J. (Szerk.): *Topics in Photosynthesis: Photoinhibition* 9. Amsterdam: Elsevier, 315 p.
- BADAWI G. H., KAWANO N., YAMAUCHI Y., SHIMADA E., SASAKI R., KUBO A., TANAKA K. (2004): Over-expression of ascorbate peroxidase in tobacco chloroplasts enhances the tolerance to salt stress and water deficit. *Physiologia Plantarum* 121: 231–238.
- BAKER C. J., ORLANDI E. W. (1995): Active oxygen in plant pathogenesis. *Annual Review of Phytopathology* 33: 299–321.
- BALÁZS E., SZIRÁKI I., KIRÁLY Z. (1977): Role of cytokinins in systemic acquired-resistance of tobacco hypersensitive to tobacco mosaic-virus. *Physiological Plant Pathology* 11: 29–37.
- BALTRUSCHAT H., FODOR J., HARRACH B. D., NIEMCZYK E., BARNA B., GULLNER G., JANECHKO A., KOGEL K.-H., SCHÄFER P., SCHWARCZINGER I., ZUCCARO A., SKOCZOWSKI A. (2008): Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytologist* 180: 501–510.
- BARAZANI O., VON DAHL C. C., BALDWIN I. T. (2007): *Sebacina vermifera* promotes the growth and fitness of *Nicotiana attenuata* by inhibiting ethylene signalling. *Plant Physiology* 144: 1223–1232.
- BARNA B. (1995): Betegség- és abiotikus stressztoleráns növények előállítása a juvenilitás és az antioxidáns kapacitás fokozásával. *Növénytermelés* 44: 561–567.

- BARNA B. (1998): A kórokozó és a növény kölcsönhatása. 17–44. p. In: ÉRSEK T., GÁBORJÁNYI R. (Szerk.): *Növénykórokozó mikroorganizmusok*. Budapest: ELTE Eötvös Kiadó, 288 p.
- BARNA B., ÁDÁM A. L., GULLNER G., KIRÁLY Z. (1995): The role of antioxidant systems and juvenility in tolerance of plants to diseases and abiotic stresses. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 30: 39–45.
- BARNA B., ÁDÁM A. L., KIRÁLY Z. (1997): Increased levels of cytokinin induce tolerance to necrotic diseases and various oxidative stress-causing agents in plants. *Phyton* 37: 25–31.
- BARNA B., ÁDÁM A., KIRÁLY Z. (1993): Juvenility and resistance of a superoxide-tolerant plant to diseases and other stresses. *Naturwissenschaften* 80: 420–422.
- BARNA B., FODOR J., POGÁNY M., KIRÁLY Z. (2003a): Role of reactive oxygen species and antioxidants in plant disease resistance. *Pest Management Science* 59: 459–464.
- BARNA B., FODOR J., PREUSS J., VICZIÁN O., HARRACH B. (2003b): Induction of susceptibility to powdery mildew in mlo, Mlg, Mla and wild type barley lines. 2nd International Workshop on Molecular Phytopathology – Mechanisms of Disease Susceptibility, (Rauischholzhausen, Németország, 2003. december 3–5.) Abstr. pp. 57–58.
- BARNA B., GYÖRGYI B. (1992): Resistance of young versus old tobacco leaves to necrotrophs, fusaric acid, cell wall-degrading enzymes and autolysis of membrane lipids. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 40: 247–257.
- BARNA B., SARHAN A. R. T., KIRÁLY Z. (1985): The effect of age of tomato and maize leaves on resistance to a non-specific and a host specific toxin. *Physiological Plant Pathology* 27: 159–165.
- BARTLING D., RADZIO R., STEINER U., WEILER E. W. (1993): A glutathione S-transferase with glutathione-peroxidase activity from *Arabidopsis thaliana*: molecular cloning and functional characterization. *European Journal of Biochemistry* 216: 579–586.
- BERBERICH T., HARADA M., SUGAWARA K., KODAMA H., IBA K., KUSANO T. (1998): Two maize genes encoding omega-3 fatty acid desaturase and their differential expression to temperature. *Plant Molecular Biology* 36: 297–306.
- BESTWICK C. S., BROWN I. R., BENNETT M. H. R., MANSFIELD J. W. (1997): Localization of hydrogen peroxide accumulation during the hypersensitive reaction of lettuce cells to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *The Plant Cell* 9: 209–221.

- BLIGH E. G., DYER W. J. (1959): A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology* 37: 911–917.
- BOR M., ÖZDEMİR F., TÜRKAN I. (2003): The effect of salt stress on lipid peroxidation and antioxidants in leaves of sugar beet *Beta vulgaris* L. and wild beet *Beta maritima* L. *Plant Science* 164: 77–84.
- BRADLEY D. J., KJELLBOM P., LAMB C. J. (1992): Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel rapid defense response. *Cell* 70: 21–30.
- BREHM A. E. (1863–1869): Az állatok világa.
- BURHENNE K., GREGERSEN P. L. (2000): Up-regulation of the ascorbate-dependent antioxidative system in barley leaves during powdery mildew infection. *Molecular Plant Pathology* 1: 303–314.
- CADENAS E. (1989): Biochemistry of oxygen-toxicity. *Annual Review of Biochemistry* 58: 79–110.
- CAO W. H., LIU J., HE X. J., MU R. L., ZHOU H. L., CHEN S. Y., ZHANG J. S. (2006): Modulation of ethylene responses affects plant salt-stress responses. *Plant Physiology* 143: 707–719.
- CHAEERLE L., VAN CAENEGHEM W., MESSENS E., LAMBERS H., VAN MONTAGU M., VAN DER STRAETEN D. (1999): Presymptomatic visualization of plant–virus interactions by thermography. *Nature Biotechnology* 17: 813–816.
- CHEN G. X., ASADA K. (1989): Ascorbate peroxidase in tea leaves: occurrence of two isozymes and their differences in enzymatic and molecular properties. *Plant and Cell Physiology* 30: 987–998.
- CHIVASA S., CARR J. P. (1998): Cyanide restores N gene-mediated resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco expressing salicylic acid hydroxylase. *The Plant Cell* 10: 1489–1498.
- CLIJSTERS H., CUYPERS A., VANGRONSVELD J. (1999): Physiological responses to heavy metals in higher plants; defence against oxidative stress. *Zeitschrift für Naturforschung C – A Journal of Biosciences* 54: 730–734.

- CÓRDOBA-PEDREGOSA M. C., VILLALBA J. M., CÓRDOBA F., GONZÁLEZ-REYES J. A. (2005): Changes in intracellular and apoplastic peroxidase activity, ascorbate redox status, and root elongation induced by enhanced ascorbate content in *Allium cepa* L. *Journal of Experimental Botany* 56: 685–694.
- CRIDDLE R. S., HANSEN L. D., BREIDENBACH R. W., WARD M. R., HUFFAKER R. C. (1989): Effects of NaCl on metabolic heat evolution rates by barley roots. *Plant Physiology* 90: 53–58.
- DANGL J., HOLUB E. (1997): La dolce vita: a molecular feast in plant–pathogen interactions. *Cell* 91: 17–24.
- DARLEY-USMAR V., WISEMAN H., HALLIWELL B. (1995): Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance. *FEBS Letters* 369: 131–135.
- DAT J., VANDENABEELE S., VRANOVÁ E., VAN MONTAGU M., INZÉ D., VAN BREUSEGEM F. (2000): Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cellular and Molecular Life Sciences* 57: 779–795.
- DE LEÓN I. P., SANZ A., HAMBERG M., CASTRESANA C. (2002): Involvement of the *Arabidopsis* alpha-DOX1 fatty acid dioxygenase in protection against oxidative stress and cell death. *Plant Journal* 29: 61–72.
- DEÁK M., HORVÁTH G. V., DAVLETOVA S., TÖRÖK K., SASS L., VASS I., BARNA B., KIRÁLY Z., DUDITS D. (1999): Plants ectopically expressing the iron-binding protein, ferritin, are tolerant to oxidative damage and pathogens. *Nature Biotechnology* 17: 192–196.
- DEGOUSÉE N., TRIANTAPHYLIDÈS C., STAREK S., IACAZIO G., MARTINI D., BLADIER C., VOISINE R., MONTILLET J. L. (1995): Measurement of thermally produced volatile alkanes – an assay for plant hydroperoxy fatty-acid evaluation. *Analytical Biochemistry* 224: 524–531.
- DELANEY T. P., UKNES S., VERNOOIJ B., FRIEDRICH L., WEYMANN K., NEGROTTO D., GAFFNEY T., GUT-RELLA M., KESSMANN H., WARD E., RYALS J. (1994): A central role of salicylic-acid in plant-disease resistance. *Science* 266: 1247–1250.
- DERTINGER U., SCHAZ U., SCHULZE E.-D. (2003): Age-dependence of the antioxidative system in tobacco with enhanced glutathione reductase activity or senescence-induced production of cytokinins. *Physiologia Plantarum* 119: 19–29.
- DÉVÉNYI T. (1975): Dr. Ezésez Géza karrierje avagy Tudósok és rágcsálók. Budapest: Gondolat Kiadó.

- DIAZ-VIVANCOS P., RUBIO M., MESONERO V., PERIAGO P. M., ROS BARCELÓ A., MARTÍNEZ-GÓMEZ P., HERNÁNDEZ J. A. (2006): The apoplastic antioxidant system in *Prunus*: response to long-term plum pox virus infection. *Journal of Experimental Botany* 57: 3813–3824.
- DOKE N., OHASHI Y. (1988): Involvement of an O_2^- generating system in the induction of necrotic lesions on tobacco leaves infected with tobacco mosaic virus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 32: 163–175.
- DRUEGE U., BALTRUSCHAT H., FRANKEN P. (2007): *Piriformospora indica* promotes adventitious root formation in cuttings. *Scientia Horticulturae* 112: 422–426.
- DUMELIN E. E., TAPPEL A. L. (1977): Hydrocarbon gases produced during *in vitro* peroxidation of polyunsaturated fatty-acids and decomposition of preformed hydroperoxides. *Lipids* 12: 894–900.
- ECKEY C., KORELL M., LEIB K., BIEDENKOPF D., JANSEN C., LANGEN G., KOGEK K.-H. (2004): Identification of powdery mildew-induced barley genes by cDNA-AFLP: functional assessment of an early expressed MAP kinase. *Plant Molecular Biology* 55(1): 1–15.
- ELKAHOUI S., SMAOUI A., ZARROUK M., GHRIR R., LIMAM H. (2004): Salt-induced lipid changes in *Catharanthus roseus* cultured cell suspensions. *Phytochemistry* 65: 1911–1917.
- ELSTNER E. F. (1982): Oxygen activation and oxygen-toxicity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 33: 73–96.
- EL-ZAHABY H. M., GULLNER G., KIRÁLY Z. (1995): Effects of powdery mildew infection of barley on the ascorbate–glutathione cycle and other antioxidants in different host–pathogen interactions. *Phytopathology* 85: 1225–1230.
- ENYEDI A. J., YALPANI N., SILVERMAN P., RASKIN I. (1992): Localization, conjugation, and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 89: 2480–2484.
- EPSTEIN E., NORLYN J. D., RUSH D. W., KINGSBURY R. W., KELLEY D. B., CUNNINGHAM G. A., WRONA A. F. (1980): Saline culture of crops – a genetic approach. *Science* 210: 399–404.
- EULGEM T., RUSHTON P. J., ROBATZEK S., SOMSSICH I. E. (2000): The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends in Plant Science* 5: 199–206.
- FADZILLA N. M., FINCH R. P., BURDON R. H. (1997): Salinity, oxidative stress and antioxidant responses in shoot cultures of rice. *Journal of Experimental Botany* 48: 325–331.

- FAUTH R., HOFFMANN G. M. (1992): Determination of quantitative resistance of wheat genotypes against *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici* by analysis of the amount of postinfectionally produced ethylene. *Journal of Plant Diseases and Protection* 99: 39–55.
- FELLE H. H., HERRMANN A., HANSTEIN S., HÜCKELHOVEN R., KOGEL K.-H. (2004): Apoplastic pH signaling in barley leaves attacked by the powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Molecular Plant–Microbe Interactions* 17: 118–123.
- FLOSH J., LEES M., SLOANEY-STANLEY G. H. (1957): A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *Journal of Biological Chemistry* 226: 497–509.
- FODOR J., GULLNER G., ÁDÁM A. L., BARNA B., KŐMÍVES T., KIRÁLY Z. (1997): Local and systemic responses of antioxidants to tobacco mosaic virus infection and to salicylic acid in tobacco: Role in systemic acquired resistance. *Plant Physiology* 114: 1443–1451.
- FODOR J., HARRACH B. D., JANECKO A., BARNA B., SKOCZOWSKI A. (2007): Metabolic responses of tobacco to induction of systemic acquired resistance. *Thermochimica Acta* 466: 29–34.
- FODOR J., HIDEG É., KECSKÉS A., KIRÁLY Z. (2001): *In vivo* detection of tobacco mosaic virus-induced local and systemic oxidative burst by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Plant and Cell Physiology* 42: 775–779.
- FOYER C. H. (1993): Ascorbic acid. 31–58. p. In: ALSCHER R. G., HESS J. L. (Szerk.): *Antioxidants in Higher Plants*. Boca Raton, FL: CRC Press, 174 p.
- FOYER C. H., NOCTOR G. (2000): Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling. *New Phytologist* 146: 359–388.
- FOYER C. H., NOCTOR G. (2005): Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant, Cell & Environment* 28: 1056–1071.
- FOYER C. H., ROWELL J., WALKER D. (1983): Measurements of the ascorbate content of spinach leaf protoplasts and chloroplasts during illumination. *Planta* 157: 239–244.
- FOYER C. H., SOURIAU N., PERRET S., LELANDAIS M., KUNERT K. J., PRUVOST C., JOUANIN L. (1995): Overexpression of glutathione reductase but not glutathione synthetase leads to increases in antioxidant capacity and resistance to photoinhibition in poplar trees. *Plant Physiology* 109: 1047–1057.

- GAFFNEY T., FRIEDRICH L., VERNOOIJ B., NEGROTTA D., NYE G., UKNES S., WARD E., KESSMANN H., RYALS J. (1993): Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance. *Science* 261: 754–756.
- GALLEGO S. M., BENAVIDES M. P., TOMARO M. (1996): Effect of heavy metal ion excess on sunflower leaves: evidence for involvement of oxidative stress. *Plant Science* 121: 151–159.
- GORDON L. K., MINIBAYEVA F. V., RAKHMATULLINA D. F., ALYABYEV A. J., OGORODNIKOVA T. I., LOSEVA N. L., VALITOVA Y. N. (2004): Heat production of wheat roots induced by the disruption of proton gradient by salicylic acid. *Thermochimica Acta* 422: 101–104.
- GOSSETT D. R., MILLHOLLON E. P., LUCAS M. C. (1994): Antioxidant response to NaCl stress in salt-tolerant and salt-sensitive cultivars of cotton. *Crop Science* 34: 706–714.
- GRACE S. C., PACE R., WYDRZYNSKI T. (1995): Formation and decay of monodehydroascorbate radicals in illuminated thylakoids as determined by EPR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta* 1229: 155–165.
- GRANT J. J., LOAKE G. J. (2000): Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* 124: 21–29.
- GROSS G. G. (1978): Biosynthesis of lignin and related monomers. *Recent Advances in Phytochemistry* 11: 141–184.
- GRUNWALD C. (1978) Shading influence on the sterol balance of *Nicotiana tabacum* L. *Plant Physiology* 61: 76–79.
- GUETA-DAHAN Y., YANIV Z., ZILINSKAS B. A., BEN-HAYYIM G. (1997): Salt and oxidative stress: similar and specific responses and their relation to salt tolerance in *Citrus*. *Planta* 203: 460–469.
- HAFEZ Y. M., FODOR J., KIRÁLY Z. (2004) Establishment of acquired resistance confers reduced levels of superoxide and hydrogen peroxide in TMV-infected tobacco leaves. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 39: 347–360.
- HAFEZ Y. M., KIRÁLY Z. (2003): Role of hydrogen peroxide in symptom expression of barley susceptible and resistant to powdery mildew. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 38: 227–236.
- HAMMOND-KOSACK K. E., JONES J. D. G. (1996): Resistance gene-dependent plant defence responses. *The Plant Cell* 8: 1773–1791.

- HARRACH B. D., FODOR J., POGÁNY M., PREUSS J., BARNA B. (2008): Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. *European Journal of Plant Pathology* 121: 21–33.
- HEGEDŰS A., ERDEI S., HORVÁTH G. (1997): Is colchicine a stress-factor? *Horticultural Science* 29: 53–57.
- HEGEDŰS A., ERDEI S., HORVÁTH G. (2001): Comparative studies of H₂O₂ detoxifying enzymes in green and greening barley seedlings under cadmium stress. *Plant Science* 160: 1085–1093.
- HEGEDŰS A., ERDEI S., JANDA T., TÓTH E., HORVÁTH G., DUDITS D. (2004): Transgenic tobacco plants overproducing alfalfa aldose/aldehyde reductase show higher tolerance to low temperature and cadmium stress. *Plant Science* 166: 1329–1333.
- HEGEDŰS A., JANDA T., HORVÁTH G. V., DUDITS D. (2008): Accumulation of overproduced ferritin in the chloroplast provides protection against photoinhibition induced by low temperature in tobacco plants. *Journal of Plant Physiology* 165: 1647–1651.
- HEISER I., OSSWALD W. F., ELSTNER E. F. (1998): Photodynamic ethane and ethylene formation from α -linolenic acid catalyzed by cytokinins and copper ions. *Journal of Plant Physiology* 152: 230–234.
- HEITEFUSS R. (2001): Defence reactions of plants to fungal pathogens: principles and perspectives, using powdery mildew as an example. *Naturwissenschaften* 88: 273–283.
- HERNÁNDEZ J. A., JIMÉNEZ A., MULLINEAUX P. M., SEVILLA F. (2000): Tolerance of pea (*Pisum sativum* L.) to long-term salt stress is associated with induction of antioxidant defenses. *Plant, Cell & Environment* 23: 853–862.
- HERNÁNDEZ J. A., OLMOS E., CORPAS F. J., SEVILLA F., DEL RÍO L. A. (1995): Salt-induced oxidative stress in chloroplasts of pea plants. *Plant Science* 105: 151–167.
- HORVÁTH G. V., OBERSCHALL A., DEÁK M., SASS L., VASS I., BARNA B., KIRÁLY Z., HIDEG É., FEHÉR A., DUDITS D. (1999): Transgenic strategy to improve stress resistance of crop plants. *Journal of Plant Biotechnology* 1: 61–68.
- HUANG C., HE W., GUO J., CHANG X., SU P., ZHANG L. (2005): Increased sensitivity to salt stress in an ascorbate-deficient *Arabidopsis* mutant. *Journal of Experimental Botany* 56: 3041–3049.

- HÜCKELHOVEN R., DECHERT C., KOGEL K.-H. (2003): Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of *mlo*-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 100: 5555–5560.
- HÜCKELHOVEN R., DECHERT C., TRUJILLO M., KOGEL K.-H. (2001): Differential expression of putative cell death regulator genes in near-isogenic, resistant and susceptible barley lines during interaction with the powdery mildew fungus. *Plant Molecular Biology* 47: 739–748.
- HÜCKELHOVEN R., FODOR J., PREIS C., KOGEL K.-H. (1999): Hypersensitive cell death and papilla formation in barley attacked by the powdery mildew fungus are associated with hydrogen peroxide but not with salicylic acid accumulation. *Plant Physiology* 119: 1251–1260.
- HÜCKELHOVEN R., KOGEL K.-H. (1998): Tissue-specific superoxide generation at interaction sites in resistant and susceptible near-isogenic barley lines attacked by the powdery mildew fungus (*Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*). *Molecular Plant–Microbe Interactions* 11: 292–300.
- IM Y. J., HAN O., CHUNG G. C., CHO B. H. (2002): Antisense expression of an *Arabidopsis* omega-3 fatty acid desaturase gene reduces salt/drought tolerance in transgenic tobacco plants. *Molecules and Cells* 13: 264–271.
- IM Y., KIM M. S., YANG K. Y., KIM Y., BACK K., CHO B. H. (2004): Antisense expression of a omega-3 fatty acid desaturase gene in tobacco plants enhances susceptibility against pathogens. *Canadian Journal of Botany* 82: 297–303.
- JAMESON P. E. (2000): Cytokinins and auxins in plant–pathogen interactions – An overview. *Plant Growth Regulation* 32: 369–380.
- JANDA T., CSÉPLŐ M., NÉMETH CS., VIDA GY., POGÁNY M., SZALAI G., VEISZ O. (2008): Combined effect of water stress and infection with the necrotrophic fungal pathogen *Drechslera tritici-repentis* on growth and antioxidant activity in wheat. *Cereal Research Communications* 36: 53–64.
- JANDA T., HORVÁTH E., SZALAI G., PÁLDI E. (2007a): Role of salicylic acid in the induction of abiotic stress tolerance. 91–150. p. In: HAYAT S., AHMAD A. (Szerk.): *Salicylic acid: a plant hormone*. Heidelberg: Springer, 401 p.

- JANDA T., SZALAI G., LESKÓ K., YORDANOVA R., APOSTOL S., POPOVA L. P. (2007b): Factors contributing to enhanced freezing tolerance in wheat during frost hardening in the light. *Phytochemistry* 68: 1674–1682.
- JANECZKO A., TÓBIÁS I., SKOCZOWSKI A., DUBERT F., GULLNER G., BARNA B. (2007): Bacterial infection and pre-treatment with 24-epibrassinolide markedly affect the heat emission and membrane permeability of rape cotyledons. *Thermochimica Acta* 458: 88–91.
- JOLIVET Y., PIREAUX J. C., DIZENGREMEL P. (1990): Changes in properties of barley leaf mitochondria isolated from NaCl-treated plants. *Plant Physiology* 94: 641–646.
- JOO J. H., BAE Y. S., LEE J. S. (2001): Role of auxin-induced reactive oxygen species in root gravitropism. *Plant Physiology* 126: 1055–1060.
- KÁDÁR I. (1993): Adatok a közlekedés, település és az ipar által okozott talajszennyezés megítéléséhez. *Növénytermesztés* 42: 185–190.
- KAPULNIK Y., YALPANI N., RASKIN I. (1992): Salicylic acid induces cyanide-resistant respiration in tobacco cell-suspension cultures. *Plant Physiology* 100: 1921–1926.
- KERBY K., SOMERVILLE S. (1989): Enhancement of specific intercellular peroxidases following inoculation of barley with *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 35: 323–337.
- KIRÁLY L., BARNA B., KIRÁLY Z. (2007): Plant resistance to pathogen infection: forms and mechanisms of innate and acquired resistance. *Journal of Phytopathology* 155: 385–396.
- KIRÁLY L., HAFEZ Y. M., FODOR J., KIRÁLY Z. (2008): Suppression of tobacco mosaic virus-induced hypersensitive-type necrotization in tobacco at high temperature is associated with downregulation of NADPH oxidase and superoxide and stimulation of dehydroascorbate reductase. *Journal of General Virology* 89: 799–808.
- KIRÁLY Z., BARNA B. (2007): Alapfogalmak. 9–17. p. In: GÁBORJÁNYI R., KIRÁLY Z. (Szerk.): *Molekuláris növénykórtan – Támadás és védekezés*. Budapest: Agroinform Kiadó, 340 p.
- KIRÁLY Z., BARNA B., KECSKÉS A., FODOR J. (2002) Down-regulation of antioxidative capacity in a transgenic tobacco which fails to develop acquired resistance to necrotization caused by TMV. *Free Radical Research* 36: 981–991.
- KIRÁLY Z., EL-ZAHABY H. M. (2000): Effect of reactive oxygen species on rust and powdery mildew pathogens and on symptoms. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 35: 239–240.

- KLAPHECK S., ZIMMER I., COSSE H. (1990): Scavenging of hydrogen peroxide in the endosperm of *Ricinus communis* by ascorbate peroxidase. *Plant and Cell Physiology* 31: 1005–1013.
- KØLSTER P., MUNK L., STØLEN O., LØHDE J. (1986): Near-isogenic barley lines with genes for resistance to powdery mildew. *Crop Science* 26: 903–907.
- KORMANIK P. P., MCGRAW A. C. (1982): Quantification of vesicular-arbuscular mycorrhizae in plant roots. 37–45. p. In: SCHENCK N. C. (Szerk.): *Methods and principles of mycorrhizal research*. St. Paul: American Phytopathological Society.
- KRISTENSEN B. K., BLOCH H., RASMUSSEN S. K. (1999): Barley coleoptile peroxidases. Purification, molecular cloning, and induction by pathogens. *Plant Physiology* 120: 501–512.
- KRUPA Z., BASZYNSKI T. (1995): Some aspects of heavy-metals toxicity towards photosynthetic apparatus – direct and indirect effects on light and dark reactions. Conference on Photochemical Processes in Plants Under Environmental Stresses (8–9 June 1995, Kazimeierz Dolny, Poland) *Acta Physiologiae Plantarum* 17: 177–190.
- KUĆ J. (1982): Induced immunity to plant disease. *BioScience* 32: 854–860.
- LÁNG F., SZIGETI Z., FODOR F., CSEH E., ZOLLA L., SÁRVÁRI É. (1998): Influence of Cd and Pb on the ion content, growth and photosynthesis in cucumber. XIth International Congress on Photosynthesis – Mechanisms and Effects (17–22 August 1998, Budapest, Hungary) 2693–2696 p. In: GARAB GY. (Szerk.): *Photosynthesis: Mechanisms and Effects*, Vol. IV. Dordrecht: Kluwer Academic Publisher.
- LARKINDALE J., HUANG B. (2004) Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *Journal of Plant Physiology* 161: 405–413.
- LAW M. Y., CHARLES S. A., HALLIWELL B. (1983): Glutathione and ascorbic acid in spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts. The effect of hydrogen peroxide and of paraquat. *Biochemical Journal* 210: 899–903.
- LEIB K. (2005): Untersuchungen zum Resistenzmechanismus der Gerste (*Hordeum vulgare* L.) gegenüber dem Gerstenmehltaupilz (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*). Justus-Liebig-Universität Gießen, Németország. *Doktori (Ph.D.) disszertáció* 195 p.

- LETERRIER M., CORPAS F. J., BARROSO J. B., SANDALIO L. M., DEL RÍO L. A. (2005): Peroxisomal monodehydroascorbate reductase. Genomic clone characterization and functional analysis under environmental stress conditions. *Plant Physiology* 138: 2111–2123.
- LEVINE A., TENHAKEN R., DIXON R. A., LAMB, C. (1994): H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79: 583–593.
- LIANG Y. C., ZHANG W. H., CHEN Q., LIU Y. L., DING R. X. (2005): Effects of silicon on H⁺-ATPase and H⁺-PPase activity, fatty acid composition and fluidity of tonoplast vesicles from roots of salt-stressed barley (*Hordeum vulgare* L.) *Environmental and Experimental Botany* 53: 29–37.
- LINNAEUS C. (1753): *Species Plantarum*.
- LOSEVA N. L., GORDON L. K., MINIBAYEVA F. V., ALYABYEV A. J., CHERNOV V. M., CHERNOVA O. A., ANDREYEVA I. N., RACHIMOVA G. G., TRIBUNSKIY V. I., ESTRINA R. I., GOGOLEV J. B., KEMP R. B. (2002): Direct and indirect calorimetric studies of stress responses of chlorella cells to infection with the mycoplasma, *Acholeplasma laidlawii*. *Thermochimica Acta* 390: 39–46.
- LU H., HIGGINS V. J. (1998): Measurement of active oxygen species generated *in planta* in response to elicitor AVR9 of *Cladosporium fulvum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52: 35–51.
- MALAMY J., CARR J. P., KLESSIG D. F., RASKIN I. (1990): Salicylic-acid – a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral-infection. *Science* 250: 1002–1004.
- MALAN C., GREYLING M. M., GRESSEL J. (1990): Correlation between CuZn superoxide dismutase and glutathione reductase, and environmental and xenobiotic stress tolerance in maize inbreds. *Plant Science* 69: 157–166.
- MANNERNVIK B., DANIELSON U. H. (1988): Glutathione transferases structure and catalytic activity. *CRC Critical Reviews in Biochemistry* 23: 283–337.
- MARRS K. A. (1996): The functions and regulation of glutathione S-transferases in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 47: 127–158.
- MAUCH, F., DUDLER, R. (1993): Differential induction of distinct glutathione-S-transferases of wheat by xenobiotics and by pathogen attack. *Plant Physiology* 102: 1193–1201.

- MCGONIGLE T. P., MILLER M. H., EVANS D. G., FAIRCHILD G. L., SWAN J. A. (1990): A new method which gives an objective measure of colonization of roots by vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 115: 495–501.
- MEHLHORN H., LELANDAIS M., KORTH H. G., FOYER C. H. (1996): Ascorbate is the natural substrate for plant peroxidases. *FEBS Letters* 378: 203–206.
- MÉTRAUX J.-P., SIGNER H., RYALS J., WARD E., WYSSBENZ M., GAUDIN J., RASCHDORF K., SCHMID E., BLUM W., INVERARDI B. (1990): Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250: 1004–1006.
- MILLER G., SUZUKI N., RIZHSKY L., HEGIE A., KOUSSEVITZKY S., MITTLER R. (2007): Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses. *Plant Physiology* 144: 1777–1785.
- MITTLER R., SHULAEV V., SESKAR M., LAM E. (1996): Inhibition of programmed cell death in tobacco plants during a pathogen-induced hypersensitive response at low oxygen pressure. *The Plant Cell* 8: 1991–2001.
- MITTOVA V., GUY M., TAL M., VOLOKITA M. (2004): Salinity up-regulates the antioxidative system in root mitochondria and peroxisomes of the wild salt-tolerant tomato species *Lycopersicon pennellii*. *Journal of Experimental Botany* 55: 1105–1113.
- MOK D. W. S., MOK M. C. (2001): Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 89–118.
- MONTILLET J. L., AGNEL J. P., PONCHET M., VAILLEAU F., ROBY D., TRIANTAPHYLIDES C. (2002): Lipoxygenase-mediated production of fatty acid hydroperoxides is a specific signature of the hypersensitive reaction in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 40: 633–639.
- MORRIS K., MACKERNESS S. A. H., PAGE T., JOHN C. F., MURPHY A. M., CARR J. P., BUCHANAN-WOLLASTON V. (2000): Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. *Plant Journal* 23: 677–685.
- MUNNS R., TESTER M. (2008): Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651–681.

- NAGAMIYA K., MOTOHASHI T., NAKAO K., PRODHAN S. H., HATTORI E., HIROSE S., OZAWA K., OHKAWA Y., TAKABE T., TAKABE T., KOMAMINE A. (2007): Enhancement of salt tolerance in transgenic rice expressing an *Escherichia coli* catalase gene, *katE*. *Plant Biotechnology Reports* 1: 49–55.
- NAKANO Y., ASADA K. (1981): Hydrogen peroxide is scavenged by ascorbate-specific peroxidase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 22: 867–880.
- NANDI A., WELTI R., SHAH J. (2004): The *Arabidopsis thaliana* dihydroxyacetone phosphate reductase gene *SUPPRESSOR OF FATTY ACID DESATURASE DEFICIENCY1* is required for glycerolipid metabolism and for the activation of systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 16: 465–477.
- NEWMAN E. I., REDDELL P. (1987): The distribution of mycorrhizas among families of vascular plants. *New Phytologist* 106: 745–751.
- NOCTOR G., ARISI A. C. M., JOUANIN L., KUNERT K. J., RENNENBERG H., FOYER C. H. (1998): Glutathione: biosynthesis, metabolism and relationship to stress tolerance explored in transformed plants. *Journal of Experimental Botany* 49: 623–647.
- NOCTOR G., FOYER C. H. (1998). Ascorbate and glutathione: Keeping active oxygen under control. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 49: 249–279.
- OLSON P. D., VARNER J. E. (1993): Hydrogen peroxide and lignification. *Plant Journal* 4: 887–892.
- OUF M. F., GAZAR A. A., SHEHATA Z. A., ABDOL E. S., KIRÁLY Z., BARNA, B. (1993): The effect of superoxide anion on germination and infectivity of wheat-stem rust (*Puccinia graminis* Pers f. sp. *tritici* Eriks & Henn) uredospores. *Cereal Research Communications* 21: 31–37.
- PAOLETTI F., MOCALI A. (1990): Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. *Methods in Enzymology* 186: 209–220.
- PASTERNAK T. P., ÖTVÖS K., DOMOKI M., FEHÉR A. (2007): Linked activation of cell division and oxidative stress defense in alfalfa leaf protoplast-derived cells is dependent on exogenous auxin. *Plant Growth Regulation* 51: 109–117.
- PASTORI G. M., FOYER C. H. (2002): Common components, networks, and pathways of cross-tolerance to stress. The central role of "redox" and abscisic acid-mediated controls. *Plant Physiology* 129: 460–468.

- PEŠKAN-BERGHÖFER T., SHAHOLLARI B., GIONG P. H., HEHL S., MARKERT C., BLANKE V., KOST G., VARMA A., OELMÜLLER R. (2004): Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant–microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane. *Physiologia Plantarum* 122: 465–477.
- PIFFANELLI P., ZHOU F. S., CASAIS C., ORME J., JAROSCH B., SCHAFFRATH U., COLLINS N. C., PANSTRUGA R., SCHULZE-LEFERT P. (2002): The barley MLO modulator of defense and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant Physiology* 129: 1076–1085.
- POGÁNY M., HARRACH B. D., HAFEZ Y. M., BARNA B., KIRÁLY Z., PÁLDI E. (2006): Role of reactive oxygen species in abiotic and biotic stresses in plants. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 41: 23–35.
- POGÁNY M., KOEHL J., HEISER I., ELSTNER E. F., BARNA B. (2004): Juvenility of tobacco induced by cytokinin gene introduction decreases susceptibility to *Tobacco necrosis virus* and confers tolerance to oxidative stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65: 39–47.
- RABE R., KREEB K. H. (1979): Enzyme-activities and chlorophyll and protein-content in plants as indicators of air-pollution. *Environmental Pollution* 19: 119–137.
- RASKIN I., EHMAN A., MELANDER W. R., MEEUSE B. J. D. (1987): Salicylic acid: a natural inducer of heat production in *Arum* lilies. *Science* 237: 1601–1602.
- RASKIN I., TURNER I. M., MELANDER W. R. (1989): Regulation of heat-production in the inflorescences of an *Arum* lily by endogenous salicylic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 86: 2214–2218.
- RATHMELL W. G., SEQUEIRA L. (1974): Soluble peroxidase in fluid from the intercellular spaces of tobacco leaves. *Plant Physiology* 53: 317–318.
- RENARD-MERLIER D., RANDOUX B., NOWAK E., FARCY F., DURAND R., REIGNAULT P. (2007): Iodine 40, salicylic acid, heptanoyl salicylic acid and trehalose exhibit different efficacies and defence targets during a wheat/powdery mildew interaction. *Phytochemistry* 68: 1156–1164.
- RODRIGUEZ R. J., HENSON J., VAN VOLKENBURGH E., HOY M., WRIGHT L., BECKWITH F., KIM Y. O., REDMAN R. S. (2008): Stress tolerance in plants via habitat-adapted symbiosis. *The ISME Journal* 2: 404–416.

- RODRIGUEZ R. J., REDMAN R. S., HENSON J. (2004): The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change* 9: 261–272.
- ROSS A. F. (1961): Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology* 14: 340–358.
- RUZICKSKA P., GOMBOS Z., FARKAS G. (1983): Modification of the fatty acid composition of phospholipids during the hypersensitive reaction in tobacco. *Virology* 128: 60–64.
- RYALS J., NEUENSCHWANDER U. H., WILLITS M. G., MOLINA A., STEINER H. Y., HUNT M. D. (1996): Systemic acquired resistance. *The Plant Cell* 8: 1809–1819.
- SALIN M. L. (1987): Toxic oxygen species and protective systems of the chloroplast. *Physiologia Plantarum* 72: 681–689.
- SANITÀ DI TOPPI L., GABBRIELLI R. (1999): Response to cadmium in higher plants. *Environmental and Experimental Botany* 41: 105–130.
- SCANDALIOS J. G. (1990): Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Advances in Genetics* 28: 1–41.
- SCHABES F. I., SIGSTAD E. E. (2004): Calorimetric studies of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) seed germination under saline stress conditions. *Thermochimica Acta* 428: 71–75.
- SCHULZE-LEFERT P., PANSTRUGA R. (2003): Establishment of biotrophy by parasitic fungi and reprogramming of host cells for disease resistance. *Annual Review of Phytopathology* 41: 641–667.
- SCHWEIZER P., VALLÉLIAN-BINDSCHEDLER L., MÖSINGER E. (1995): Heat-induced resistance in barley to the powdery mildew fungus *Erysiphe graminis* f.sp. *hordei*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 47: 51–66.
- SEKMEN A. H., TÜRKAN I., TAKIO S. (2007): Differential responses of antioxidative enzymes and lipid peroxidation to salt stress in salt-tolerant *Plantago maritima* and salt-sensitive *Plantago media*. *Physiologia Plantarum* 131: 399–411.
- SHAALTIEL Y., GLAZER A., BOCION P. F., GRESSEL J. (1988): Cross tolerance to herbicidal and environmental oxidants of plant biotypes tolerant to paraquat, sulfur dioxide and ozone. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 31: 13–23.
- SHALATA A., NEUMANN P. M. (2001): Exogenous ascorbic acid (vitamin C) increases resistance to salt stress and reduces lipid peroxidation. *Journal of Experimental Botany* 52: 2207–2211.

- SHANNON M. C. (1997): Adaptation of plants to salinity. *Advances in Agronomy* 60: 75–120.
- SHEN Q. H., SAIJO Y., MAUCH S., BISKUP C., BIERI S., KELLER B., SEKI H., ULKER B., SOMSSICH I. E., SCHULZE-LEFERT P. (2007): Nuclear activity of MLA immune receptors links isolate-specific and basal disease-resistance responses. *Science* 315: 1098–1103.
- SHIRASU K., SCHULZE-LEFERT P. (2000): Regulators of cell death in disease resistance. *Plant Molecular Biology* 44: 371–385.
- SIMPSON J., FORRESTER R., TISDALE M. J., BILLINGTON D. C., RATHBONE D. L. (2003): *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 13: 2435–2439.
- SIRRENBURG A., GÖBEL C., GROND S., CZEMPINSKI N., RATZINGER A., KARLOVSKY P., SANTOS P., FEUSSNER I., PAWLOWSKI K. (2007): *Piriformospora indica* affects plant growth by auxin production. *Physiologia Plantarum* 131: 581–589.
- SMIRNOFF N. (1998): Plant resistance to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology* 9: 214–219.
- STOKLOSA A., JANECZKO A., SKOCZOWSKI A., KIE J. (2006): Isothermal calorimetry as a tool for estimating resistance of wild oat (*Avena fatua* L.) to aryloxyphenoxypropionate herbicides. *Thermochimica Acta* 441: 203–206.
- SZÉKÁCS A., HEGEDŰS GY., TÓBIÁS I., POGÁNY M., BARNA B. (2000): Immunoassays for plant cytokinins as tools for the assessment of environmental stress and disease resistance. *Analytica Chimica Acta* 421: 135–146.
- SZIGETI Z. (1998): Növények és a stressz. 915–984. p. In: LÁNG F. (Szerk.): *Növényélettan – A növényi anyagcsere*. Budapest: ELTE Eötvös Kiadó, 1000 p.
- TANAKA A., CHRISTENSEN M. J., TAKEMOTO D., PARK P., SCOTT B. (2006): Reactive oxygen species play a role in regulating a fungus-perennial ryegrass mutualistic interaction. *The Plant Cell* 18: 1052–1066.
- THORDAL-CHRISTENSEN H., ZHANG Z., WEI Y., COLLINGE D. B. (1997): Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley–powdery mildew interaction. *Plant Journal* 11: 1187–1194.
- USHIMARU T., NAKAGAWA T., FUJIOKA Y., DAICHO K., NAITO M., YAMAUCHI Y., NONAKA H., AMAKO K., YAMAWAKI K., MURATA N. (2006): Transgenic *Arabidopsis* plants expressing the rice dehydroascorbate reductase gene are resistant to salt stress. *Journal of Plant Physiology* 163: 1179–1184.

- VALLÉLIAN-BINDSCHEDLER L., SCHWEIZER P., MÖSINGER E., MÉTRAUX J.-P. (1998): Heat-induced resistance in barley to powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) is associated with a burst of active oxygen species. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52: 185–199.
- VAN ASSCHE F., CLIJSTERS H. (1990): Effects of metals on enzyme-activity in plants. *Plant, Cell & Environment* 13: 195–206.
- VAN DER STRAETEN D., CHAERLE L., SHARKOV G., LAMBERS H., VANMONTAGU M. (1995): Salicylic acid enhances the activity of the alternative pathway of respiration in tobacco leaves and induces thermogenicity. *Planta* 196: 412–419.
- VAN LOON L. C. (1997): Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103: 753–765.
- VANACKER H., CARVER T. L. W., FOYER C. H. (1998): Pathogen-induced changes in the antioxidant status of the apoplast in barley leaves. *Plant Physiology* 117: 1103–1114.
- VANACKER H., CARVER T. L. W., FOYER C. H. (2000): Early H₂O₂ accumulation in mesophyll cells leads to induction of glutathione during the hyper-sensitive response in the barley–powdery mildew interaction. *Plant Physiology* 123: 1289–1300.
- VARMA A., VERMA S., SUDHA, SAHAY N., BÜTEHORN B., FRANKEN P. (1999): *Piriformospora indica*, a cultivable plant-growth-promoting root endophyte. *Applied Environmental Microbiology* 65: 2741–2744.
- VERMA S., VARMA A., REXER K. H., HASSEL A., KOST G., SARABHOY A., BISEN P., BÜTENHORN B., FRANKEN P. (1998): *Piriformospora indica*, gen. et sp. nov., a new root-colonizing fungus. *Mycologia* 90: 896–903.
- WALLER F., ACHATZ B., BALTRUSCHAT H., FODOR J., BECKER K., FISCHER M., HEIER T., HÜCKELHOVEN R., NEUMANN C., WETTSTEIN D., FRANKEN P., KOGEL K.-H. (2005): The endophytic fungus *Piriformospora indica* reprograms barley to salt-stress tolerance, disease resistance, and higher yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.* 102: 13386–13391.
- WALLER F., MUKHERJEE K., DESHMUKH S. D., ACHATZ B., SHARMA M., SCHÄFER P., KOGEL K.-H. (2008): Systemic and local modulation of plant responses by *Piriformospora indica* and related *Sebacinales* species. *Journal of Plant Physiology* 165 60–70.

- WANG S. Y., TZENG D. D.-S. (1998): Methionine-riboflavin mixtures with surfactants and metal ions reduce powdery mildew infection in strawberry plants. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 123: 987–991.
- WEINTRAUB M., KEMP W. G., RAGETLI H. W. (1960): Studies on the metabolism of leaves with localized virus infections. I. Oxygen uptake. *Canadian Journal of Microbiology* 6: 407–415.
- WI S. J., KIM W. T., PARK K. Y. (2006): Overexpression of carnation S-adenosylmethionine decarboxylase gene generates a broad-spectrum tolerance to abiotic stresses in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Reports* 25: 1111–1121.
- WILLEKENS H., CHAMNONGPOL S., DAVEY M., SCHRAUDNER M., LANGEBAEELS C., VAN MONTAGU M., INZÉ D., VAN CAMP W. (1997): Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *EMBO Journal* 16: 4806–4816.
- WILLEKENS H., INZÉ D., VAN MONTAGU M., VAN CAMP W. (1995): Catalase in plants. *Molecular Breeding* 1: 207–228.
- WINGATE V. P. M., LAWTON M. A., LAMB C. J. (1988): Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Physiology* 87: 206–210.
- WINGSLE G., MATTSON A., EKBLAD A., HÄLLGREN J.-E., SELSTAM E. (1992): Activities of glutathione reductase and superoxide dismutase in relation to changes of lipids and pigments due to ozone in seedlings of *Pinus sylvestris* (L.). *Plant Science* 82: 167–178.
- WYEN N. V., ERDEI S., FARKAS G. L. (1971): Isolation from *Avena* leaf tissues of nuclease with the same specificity towards RNA and DNA. Accumulation of the enzyme during leaf senescence. *Biochimica et Biophysica Acta* 232: 472–483.
- YAENO T., MATSUDA O., IBA K. (2004): Role of chloroplast trienoic fatty acids in plant disease defense responses. *Plant Journal* 40(6): 931–941.
- YANG Y. L., GUO J. K., ZHANG F., ZHAO B. L. Q., ZHANG L. X. (2004): NaCl induced changes of the H⁺-ATPase in root plasma membrane of two wheat cultivars. *Plant Science* 166: 913–918.
- YOSHIDA S., ITO M., NISHIDA I., WATANABE A. (2002): Identification of a novel gene *HYS1/CPR5* that has a repressive role in the induction of leaf senescence and pathogen-defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 29: 427–437.

- ZHANG W. H., CHEN Q., LIU Y. L. (2002): Relationship between H^+ -ATPase activity and fluidity of tonoplast in barley roots under NaCl stress. *Journal of Integrative Plant Biology* 44: 292–296.
- ZHANG Z., HENDERSON C., GURR S. J. (2004): *Blumeria graminis* secretes an extracellular catalase during infection of barley: potential role in suppression of host defence. *Molecular Plant Pathology* 5: 537–547.
- ZHAO F. G., QIN P. (2005): Protective effects of exogenous fatty acids on root tonoplast function against salt stress in barley seedlings. *Environmental and Experimental Botany* 53: 215–223.
- ŻUR I., SKOCZOWSKI A., NIEMCZYK E., DUBERT F. (2002): Changes in the composition of fatty acids and sterols of membrane lipids during induction and differentiation of *Brassica napus* (var. *oleifera* L.) callus. *Acta Physiologiae Plantarum* 24: 3–10.

M2. A dolgozat témájában megjelent legfontosabb saját közlemények

Folyóiratcikkek:

HARRACH B. D., FODOR J., POGÁNY M., PREUSS J., BARNA B. (2008): Antioxidant, ethylene and membrane leakage responses to powdery mildew infection of near-isogenic barley lines with various types of resistance. *European Journal of Plant Pathology* 121: 21–33.

BALTRUSCHAT H., FODOR J., HARRACH B. D., NIEMCZYK E., BARNA B., GULLNER G., JANECKO A., KOGEL K.-H., SCHÄFER P., SCHWARCZINGER I., ZUCCARO A., SKOCZOWSKI A. (2008): Salt tolerance of barley induced by the root endophyte *Piriformospora indica* is associated with a strong increase in antioxidants. *New Phytologist* 180: 501–510.

FODOR J., HARRACH B. D., JANECKO A., BARNA B., SKOCZOWSKI A. (2007): Metabolic responses of tobacco to induction of systemic acquired resistance. *Thermochimica Acta* 466: 29–34.

POGÁNY M., HARRACH B. D., HAFEZ Y. M., BARNA B., KIRÁLY Z., PÁLDI E. (2006): Role of reactive oxygen species in abiotic and biotic stresses in plants. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica* 41: 23–35.

Konferencia kiadványok:

HARRACH B. D., HÜCKELHOVEN R., KOGEL K.-H., BARNA B. (2007): Gene expression changes in heat-induced susceptibility of barley to powdery mildew. XIII. International Congress on Molecular Plant–Microbe Interactions (Sorrento, Olaszország, 2007. július 21–27.) Absztr. p. 333.

HARRACH B. D., BARNA B. (2004): Hydrogen peroxide and mercury tolerance of tobacco with altered antioxidant properties. 14th FESPB Congress (Krakkó, Lengyelország, 2004. augusztus 23–27.) *Acta Physiologiae Plantarum* Vol. 26, No. 3 Suppl., p. 216.

HARRACH B. D., BARNA B. (2003): Stress resistance and antioxidant capacity in tobacco plants. 4th International Conference of PhD Students (Miskolc, 2003. augusztus 11–17.) Proc. pp. 41–47.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretném Dr. Erdei Sára tanárnőnek megköszönni a segítséget, amit már diplomamunkám témavezetőjeként kaptam tőle, majd a bátorítást, hogy doktori képzésre jelentkezsem, és végül a támogatást abban, hogy jelenlegi munkahelyemre kerülhessek. Habár doktori munkámat nem az Egyetemen végeztem, tanszéki konzulensként mindvégig figyelemmel kísérte a képzésem alakulását, valamint sok elméleti és gyakorlati segítséget nyújtott a doktori fokozat megszerzéséhez vezető úton, tragikusan korán bekövetkezett haláláig.

Köszönet illeti témavezetőmet, Dr. Barna Balázst, az MTA Növényvédelmi Kutatóintézetének igazgatóját, amiért lehetővé tette számomra, hogy doktori munkámat az Intézetben végezhessem. Azon kívül, hogy izgalmas kutatási témák sokaságát kínálta föl nekem és mindvégig biztosította a kutatásokhoz szükséges anyagi és szakmai háttérrel, már a kezdetektől fogva bevont kiterjedt nemzetközi kapcsolathálózatába és együttműködési pályázataiba is, továbbá lehetőséget biztosított, hogy eredményeinket számos hazai és külföldi konferencián bemutathassam. A külföldi tanulmányútjaim során szerzett sokszínű tapasztalatokból rengeteget okulhattam nem csupán szakmai, de világ- és emberismereti szempontból is.

Doktori munkám nem jött volna létre, ha nincs mellettem közvetlen kollégám, dr. Fodor József tudományos főmunkatárs, aki napi szinten segítette munkámat fáradhatatlan szorgalommal; együttműködésünk során mind módszertani, mind kutatáselméleti ismereteit önzetlenül megosztotta velem, és közös közleményeink elkészítése nagyon során is sokat tanultam tőle.

Hálás vagyok továbbá Kórélettani kutatócsoportunk további tagjainak; Dr. Király Zoltán akadémikusnak, dr. Pogány Miklósnak és dr. Viczián Orsolyának, Dobosné Harsányi Editnek, valamint a Bakteriológiai kutatócsoport tagjainak, és ezen túlmenően Intézetünk minden további kedves munkatársának a páratlanul jó munkahelyi hangulatért, a felbecsülhetetlen értékű biztatásért és a mind szakmai, mind emberi téren bármikor készségesen nyújtott támogatásért.

A Budapesti Corvinus Egyetemről Dr. Lukács Noémi tanszékvezető támogatásáért, valamint a Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék többi, volt és jelenlegi munkatársának sok kedves segítségével is hálás köszönetemet fejezem ki.

Végül pedig külön szeretném megköszönni a dolgozatban bemutatott fényképek elkészítésében nyújtott segítséget Dr. Barna Balázsnak, dr. Pogány Miklósnak, dr. Viczián Orsolyának és Zsiros László Róbertnek.